

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**



**Validação do método de ensaio para análise de ácidos  
haloacéticos**

**Andreia Vanessa Saraiva Videira**

**Dissertação de Mestrado em Química Tecnológica**  
Especialização em Química Tecnológica

**2012**



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**



**Validação do método de ensaio para análise de ácidos  
haloacéticos**

**Andreia Vanessa Saraiva Videira**

**Dissertação de Mestrado em Química Tecnológica**

Especialização em Química Tecnológica

**Dissertação orientada por**

Doutora Cristina Oliveira (DQB/FCUL), e

Doutor Vitor Vale Cardoso (EPAL, S.A)

**2012**



## Agradecimentos

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

À Eng.<sup>a</sup> Maria João Benoniel e à Dr.<sup>a</sup> Elisabete Ferreira pela oportunidade de realização deste estágio no Laboratório Central da EPAL.

Ao Dr. Vitor Cardoso, orientador na EPAL, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes dias de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

À Dr.<sup>a</sup> Cristina Oliveira, orientadora interna, pela sua disponibilidade e interesse neste trabalho.

Ao Dr. André Lopes, que orientou este trabalho até Março, um muito obrigado por toda a ajuda durante a parte mais difícil do trabalho, e por toda a disponibilidade prestada mesmo não trabalhando diretamente comigo.

Ao Dr. André Lopes, Dr.<sup>a</sup> Ana Penetra, Dr. Alexandre Rodrigues e Dr.<sup>a</sup> Vanessa Gaffney por todo o apoio, amizade e paciência que evidenciaram ao longo do trabalho.

Não podia deixar de agradecer ao resto da equipa do laboratório, Dr.<sup>a</sup> Carina Granado, Dr.<sup>a</sup> Cristina Correia, Sr. Ângelo Pires, Sr. António Pato, pelo apoio e amizade.

Queria também agradecer à Vânia Constantino e à Conceição Alexandre por toda a disponibilidade prestada.

A todos os meus amigos e colegas um muito obrigada por toda a amizade ao longo dos tempos que foi fator importante para o meu desempenho.

Por fim, mas não menos importante, queria agradecer as pessoas que estão, de certa forma, mais perto de mim, aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado, pelo amor, apoio e princípios que sempre me inculcaram.



## Resumo

Este trabalho consistiu na implementação e validação de um método de ensaio para a identificação e quantificação de ácidos haloacéticos (HAAs) em águas de consumo. Para tal, começou por se utilizar o processo de microextracção em fase sólida (SPME), como técnica de preparação de amostra e a análise por cromatografia gasosa associada a um detetor de massa do tipo *ion trap* (GC-ITMS). Tendo em conta os resultados obtidos, foi necessário abandonar esta metodologia analítica como ferramenta de análise dos compostos em estudo.

Deste modo, a implementação e validação de um método analítico para análise de HAAs foi efetuada por cromatografia líquida de ultra resolução associada à espectrometria de massa *tandem* (UPLC-ESI-MS/MS).

Inicialmente foi efetuada a optimização, no espectrómetro de massa, das condições favoráveis à formação do ião precursor para cada HAA, dos parâmetros relacionados com a formação dos iões produto característicos de cada composto, de modo a definir as transições MRM de quantificação e qualificação características de cada HAA.

Depois de definidas as condições operativas do espectrómetro de massa, foi efetuada a otimização das condições cromatográficas com o intuito de obter o máximo de sensibilidade e resolução para todos os HAAs, no menor tempo possível.

Após otimizadas das condições do UPLC-ESI-MS/MS, procedeu-se à validação do método analítico, através da aplicação de diversos testes estatísticos, de modo a estudar a gama de trabalho, os limiares analíticos, a precisão e a exatidão.

Com o intuito de diminuir os limites de quantificação do método analítico, foi estudada uma etapa de concentração direta da amostra no *Turbo Vap*. Devido às baixas recuperações obtidas, causadas pelo fenómeno de supressão iónica, foi necessário abandonar a metodologia.

Foram analisadas algumas amostras de água de consumo, em diferentes pontos do sistema de abastecimento, que demonstraram a ocorrência predominante do ácido dicloroacético nas amostras em estudo.

**Palavras chave:** Água, ácidos haloacéticos, cromatografia líquida de ultra resolução, espectrometria de massa *tandem*.

## Abstract

This study evolved the development and validation of an assay method validation in order to identify and quantify haloacetic acids (HAAs) in drinking water. Therefore, the initial studies were performed using solid phase microextraction process (SPME) as the sample preparation technique and gas chromatography associated to an ion trap mass detector (GC-ITMS) as the analytical instrumentation. However, due to the abnormal results obtained, it was necessary to abandon this approach as the analytical assay for HAAs in drinking water.

For this reason, the analytical method implementation and validation for the analysis of HAAs, was performed by ultra performance liquid chromatography associated with tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS).

Mass spectrometer conditions were optimized to obtain the best precursor ion and two characteristic product ions to define the quantification and qualification MRM transitions of each HAA.

After defining the operating conditions of the mass spectrometer, it was performed the optimization of chromatographic conditions in order to obtain maximum sensitivity and resolution for all HAAs, with the shortest chromatographic run.

The analytical method was validated after the optimization of the operating conditions of UPLC-ESI-MS/MS. Several statistic tests were applied to study the working range, analytical limits, precision and accuracy.

In order to reduce the quantification limits of the analytical method, a sample concentration step was studied using a Turbo Vap evaporation system. However, it was necessary to abandon the method due to the low percentage recoveries explained by ion suppression effects of the matrix in the mass spectrometer.

Some drinking water samples from different points of the EPAL's water supply system were analyzed, which demonstrated the prevalence of dichloroacetic acid in these samples.

**Key words:** Water, haloacetic acids, ultra performance liquid chromatography, tandem mass spectrometry.



## Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract.....	iv
Índice. ....	v
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas .....	xv
Símbolos e Abreviaturas .....	xix
Introdução .....	1
Capítulo 1 – Tratamento da Água.....	3
1.1. Origens da Água de Consumo .....	3
1.1.1. EPAL.....	3
1.2.Tratamento da Água.....	6
1.2.1. Armazenamento .....	6
1.2.2. Gradagem .....	6
1.2.3.Microtamização .....	7
1.2.4. Pré-oxidação.....	7
1.2.5. Arejamento .....	7
1.2.6. Coagulação/ Floculação .....	8
1.2.7. Sedimentação .....	9
1.2.8. Filtração.....	9
1.2.9. Outros Processos .....	10
1.2.9.1. Remoção de Ferro e Manganês .....	10
1.2.9.2. Amaciamento.....	11
1.2.10.Estabilidade .....	11

1.2.11. Desinfecção .....	12
1.2.11.1. Radiação Ultravioleta.....	13
1.2.11.2. Ozonização .....	13
1.2.11.3. Cloro e Derivados .....	14
1.2.11.3.1. Cloragem .....	14
1.2.11.3.2. Cloraminas.....	16
1.2.11.3.3. Dióxido de Cloro .....	17
1.3. Vantagens e Desvantagens dos Diferentes Tipos de Desinfetantes .....	17
1.4. Tipo de Tratamento Utilizado nas ETAs da EPAL .....	20
1.5. Formação de Subprodutos de Desinfecção .....	21
1.6. Fatores que Influenciam a Formação de DBPs .....	23
1.6.1. Tipo e Dose de Desinfetante .....	23
1.6.2. Temperatura, pH e Tempo de Contacto .....	23
1.6.3. Presença de Bromo .....	24
1.6.4. Composição da Matéria Orgânica Natural da Água .....	24
Capítulo 2 - Ácidos Haloacéticos .....	27
2.1. Notas Introdutórias .....	27
2.2. Características Físico – Químicas dos Ácidos Haloacéticos .....	28
2.3. Toxicologia dos Ácidos Haloacéticos .....	29
2.4. Legislação em Vigor.....	31
Capítulo 3 - Metodologias Analíticas .....	35
3.1. Nota Introdutória .....	35
3.2. Preparação de Amostra – Microextração em Fase Sólida .....	35
3.2.1. Nota Introdutória.....	35
3.2.2. Processo de Funcionamento da SPME .....	36
3.2.3. Princípios de Operação da SPME.....	37

3.2.4. Modo de Extração .....	38
3.2.5. Parâmetros Experimentais que Afetam a Eficiência de Extração .....	39
3.2.5.1 Revestimento .....	39
3.2.5.2. Força Iônica .....	40
3.2.5.3. Efeito do pH .....	41
3.2.5.4. Efeito da Temperatura .....	41
3.2.5.5. Agitação da Amostra .....	41
3.3. Cromatografia .....	42
3.3.1. Nota Introdutória .....	42
3.3.2. Princípios Teóricos .....	42
3.4. Cromatografia Gasosa .....	47
3.4.1. Nota Introdutória .....	47
3.4.2. Cromatógrafo Gasoso .....	47
3.4.2.1. Gás de Arraste .....	48
3.4.2.2. Sistema de Injeção .....	49
3.4.2.3. Coluna e Forno .....	50
3.4.2.4. Sistema de Detecção .....	51
3.5. Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massa .....	51
3.5.1. Espectrometria de Massa .....	52
3.5.1.1. Fontes de Ionização .....	52
3.5.1.2. Analisador de Massas .....	54
3.5.1.3. Detetores .....	56
3.6. Cromatografia Líquida .....	56
3.6.1. Nota Introdutória .....	56
3.6.2. Cromatografia Líquida de Ultra Resolução .....	57
3.6.3. Tipos de Colunas de UPLC .....	60

3.7. Cromatografia Líquida associada à Espectrometria de Massa .....	61
3.7.1. Espectrometria de Massa .....	62
3.7.1.1. Fonte de Ionização .....	62
3.7.1.2. Analisador de Massa .....	64
3.8. Efeito da Matriz .....	66
Capítulo 4- Validação do Método Analítico.....	69
4.1. Nota Introdutória .....	69
4.2. Sensibilidade.....	69
4.3. Seletividade .....	70
4.4. Precisão.....	70
4.4.1. Repetibilidade .....	71
4.4.2. Precisão Intermédia.....	71
4.4.3. Reprodutibilidade.....	72
4.5. Exatidão .....	72
4.6. Quantificação.....	72
4.6.1. Curvas de Calibração .....	72
4.6.2. Limiares Analíticos do Método de Ensaio.....	74
Capítulo 5 - Parte Experimental .....	77
5.1. Procedimento Experimental Utilizando o Método SPME-GC/ITMS .....	77
5.1.1. Equipamento e Material.....	77
5.1.1.1. Equipamento .....	77
5.1.1.2. Material .....	77
5.1.2. Reagentes .....	78
5.1.2.1 Reagentes Gerais.....	78
5.1.2.2. Padrões primários.....	78
5.1.3. Preparação de Soluções .....	79

5.1.3.1 Soluções Padrão Primárias (SPP).....	79
5.1.3.2. Soluções para Otimização das Condições Cromatográficas e do Espectrómetro de Massa.....	79
5.1.3.2.1. Soluções Padrão Individuais .....	79
5.1.3.2.2. Solução Padrão Conjunta.....	79
5.1.3.3. Soluções para Otimização das Condições da SPME.....	80
5.1.3.3.1. Solução Padrão Conjunta.....	80
5.1.4. Método Analítico SPME-GC/ITMS .....	80
5.1.4.1.Otimização das Condições Cromatográficas.....	80
5.1.4.2. Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa .....	81
5.1.5. Otimização das Condições de SPME.....	82
5.2. Procedimento Experimental Utilizando o Método UPLC- ESI-MS/MS.....	84
5.2.1. Equipamento e Material .....	84
5.2.1.1. Equipamento.....	84
5.2.1.2. Material .....	85
5.2.2. Reagentes .....	85
5.2.2.1. Reagentes Gerais .....	85
5.2.2.2. Padrões Primários.....	85
5.2.2.3. Amostras.....	86
5.2.3. Preparação de Soluções.....	86
5.2.3.1. Fase Móvel .....	86
5.2.3.2. Soluções Padrão .....	87
5.2.3.2.1. Soluções Padrão Primárias (SPP) .....	87
5.2.3.3. Soluções para a Otimização das Condições de Operação do Espectrómetro de Massa.....	87
5.2.3.3.1. Soluções Padrão Individuais para Infusões (SPII).....	87

5.2.3.4. Soluções para a Otimização das Condições Cromatográficas .....	88
5.2.3.4.1. Soluções Padrão Individuais para Injeção Cromatográfica (SPIIC)	88
5.2.3.4.2. Solução Padrão Conjunta para Injeção Cromatográfica (SPCIC) ...	88
5.2.3.5. Soluções para o Estudo da Linearidade .....	88
5.2.3.5.1. Solução Padrão Conjunta para o Estudo da Linearidade (SPCEL) .	88
5.2.3.5.2. Soluções Padrão para o Estudo de Linearidade (SPEL).....	89
5.2.3.6. Soluções Padrão de Trabalho para Validação da Gama de Trabalho ..	89
5.2.3.6.1. Solução Padrão Conjunta para Validação (SPCV).....	89
5.2.3.6.2. Soluções Padrão de Trabalho para Validação (SPTV).....	90
5.2.3.7. Soluções Padrão para o Estudo da Precisão (SPEP) .....	91
5.2.3.8. Soluções Padrão da Etapa de Concentração da Amostra (SPECA).....	91
5.2.3.9. Soluções Padrão para Estudo do Efeito da Matriz (SPEM).....	92
5.2.4. Método Analítico UPLC-ESI-MS/MS.....	93
5.2.4.1. Otimização do Método Analítico .....	93
5.2.4.1.1. Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa .....	94
5.2.4.1.2. Otimização da Voltagem do Capilar .....	95
5.2.4.2. Otimização das Condições Cromatográficas .....	96
5.2.5. Validação do Método Analítico UPLC-ESI-MS/MS .....	96
5.2.5.1. Condições Cromatográficas .....	97
5.2.5.2. Condições do Espectrómetro de Massa.....	98
5.2.5.2.1. Condições do “MS Method” .....	98
5.2.5.2.2. Condições de Operação da Tune Page .....	99
5.2.5.3. Limiares Analíticos .....	100
5.2.5.4. Precisão em Condições de Repetibilidade .....	100
5.2.5.5. Precisão Intermédia.....	101
5.2.6. Etapa de Concentração da Amostra .....	101

5.2.7. Efeito de Matriz.....	101
Capítulo 6 – Apresentação e Discussão de Resultados.....	103
6.1. Método Analítico SPME-GC/ITMS .....	103
6.1.1. Otimização das Condições Cromatográficas .....	103
6.1.2. Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa.....	104
6.1.3. Otimização das Condições de SPME-GC-ITMS .....	109
6.2. Método Analítico UPLC-ESI-MS/MS.....	112
6.2.1. Otimização das Condições UPLC-ESI-MS/MS.....	112
6.2.1.1. Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa .....	112
6.2.1.1.1. Condições da Fonte de Ionização .....	112
6.2.1.1.2. Condições do Triplo Quadrupolo .....	116
6.2.1.1.3. Otimização da Voltagem de Capilar .....	119
6.2.2. Otimização das Condições Cromatográficas .....	121
6.2.2.1. Otimização das Condições de Temperatura da Coluna e Fluxo da Fase Móvel.....	121
6.2.2.2. Otimização do Volume de Injeção .....	123
6.2.3. Validação do Método UPLC-ESI-MS/MS.....	125
6.2.3.1. Estudos de linearidade.....	125
6.2.3.2. Cálculo dos Limiares Analíticos .....	128
6.2.3.3. Razão MRM1/MRM2 .....	129
6.2.3.4. Estudos de Precisão em Condições de Repetibilidade .....	130
6.2.3.5. Precisão Intermédia .....	131
6.2.4. Estudo da Influência da Etapa de Concentração no <i>Turbo Vap</i> .....	132
6.2.4.1. Otimização da Temperatura do Banho .....	132
6.2.4.2. Otimização da pressão de azoto .....	134
6.2.4.3. Ensaios de Recuperação .....	135

6.2.5. Efeito da Matriz .....	136
6.2.5.1. Etapa de Concentração da Amostra .....	136
6.2.5.2. Análise Direta das Amostras .....	138
6.2.6. Análise de Amostras .....	140
6.2.7. Cálculo de Incertezas do Método.....	142
Capítulo 7 – Conclusões e Perspetivas Futuras .....	145
Capítulo 8 – Referências Bibliográficas .....	147
Anexo 1 – Método dos mínimos quadrados .....	153
Anexo 2 – Análise de Resíduos.....	157
Anexo 3 – Teste das Áreas Normalizadas .....	159
Anexo 4 - Teste de Rikilt.....	161
Anexo 5 - Teste de Mandel.....	163
Anexo 6 – Cálculo de Incertezas .....	167
Anexo 7 – Segurança e Ambiente .....	169
Anexo 8 – Orçamento.....	171



## Índice de Figuras

Figura 1- Esquema representativo do sistema de Abastecimento de água da EPAL.....	4
Figura 2 - Esquema da Gestão da Qualidade da Água de Abastecimento aplicada pela EPAL. ....	5
Figura 3 – Distribuição das espécies de cloro na água em função do pH (adaptado de (21)).....	15
Figura 4- Proporção dos DBPs resultantes da cloração da água para consumo humano (adaptado de (19, 24)). ....	22
Figura 5- Mecanismo de halogenação do ácido acético em meio básico. X=Cl ou Br (32).....	28
Figura 6- Estrutura de uma seringa de SPME (adaptado de (57)). ....	36
Figura 7- Modos de extração em SPME: extração direta (a); <i>headspace</i> (b); com a utilização de uma membrana protetora (c) (adaptado de (58)). ....	38
Figura 8- Esquema representativo do processo cromatográfico (adaptado de (65)). ....	43
Figura 9 - Esquema de um cromatógrafo gasoso (adaptado de(66)). ....	48
Figura 10 - Esquema de um injetor do tipo <i>split/splitless</i> (adaptado de (69)).....	49
Figura 11 - Diagrama de funcionamento de um espectrómetro de massa (adaptado de (66)). ....	52
Figura 12- Princípio do funcionamento do modo <i>tandem</i> no <i>ion trap</i> (adaptado de (70)). ....	55
Figura 13 – Curva de <i>Van Deemter</i> para partículas de 10, 5, 3 e $\leq 2\mu\text{m}$ (adaptado de (73)). ....	58
Figura 14 - Sílica híbrida de segunda geração utilizada na fase estacionária das colunas de UPLC (adaptado de (73)).....	60
Figura 15 – Fase estacionária das colunas ACQUITY UPLC <sup>TM</sup> BEH (Adaptado de (74)). ....	61
Figura 16- Esquema do processo de ionização por <i>electrospray</i> (adaptado de(77)). ....	63
Figura 17 – Esquema de funcionamento de um quadrupolo (adaptado de(83)). ....	64
Figura 18 – Esquema de um triplo quadrupolo, espectrometria de massa <i>tandem</i> (adaptado de (82))......	65

Figura 19 - Gradiente da fase móvel e coluna cromatográfica ACQUITY UPLC BEH C8. ....	97
Figura 20 – Condições da <i>tune page</i> da fonte de ionização e do analisador de massa. ....	100
Figura 21 – Espectro de massa do TBAA obtido por electroionização.....	104
Figura 22 – Mecanismo de ionização por electroionização para o TBAA.....	106
Figura 23 – Espectro de massa do TBAA obtido por ionização química.....	106
Figura 24 - Espectro do método AMD do DBAA.....	108
Figura 25 – Variabilidade dos resultados da análise de HAA por SPME-GC-ITMS usando a fibra CAR-PDMS. ....	110
Figura 26 - Variação da intensidade de sinal do DCAA com a voltagem de cone, por <i>electrospray</i> em modo de ionização negativo. ....	114
Figura 27- Espectro de massa do ião precursor do TBAA no modo de ionização negativo, para uma voltagem de cone de 15 V.....	115
Figura 28 - Espectro de massa do DBAA obtido no modo de operação <i>Product Ion Scan</i> .....	117
Figura 29 - espectro de massa do MBAA obtido no modo de operação <i>Product Ion Scan</i> . ....	118
Figura 30 - Efeito da variação da voltagem do capilar no sinal instrumental obtido para cada HAAs.....	120
Figura 31 – Efeito do fluxo da fase móvel na sensibilidade dos HAAs.....	122
Figura 32 – Cromatograma obtido por injeção de uma solução padrão conjunta dos HAAs, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção.....	124
Figura 33 – Reta de calibração do MCAA. ....	125
Figura 34- Recuperações médias obtidas para as diferentes temperaturas do banho de água do sistema de evaporação <i>Turbo Vap</i> . ....	133
Figura 35 - Recuperações médias obtidas para as diferentes pressões de azoto no sistema de evaporação <i>Turbo Vap</i> .....	134
Figura 36 – Recuperação média do efeito de matriz em água ultra pura e água da torneira fortificada depois da etapa de concentração no <i>Turbo Vap</i> . ....	137

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Desinfetantes utilizados no tratamento de água para consumo humano (adaptado de (17)).	19
Tabela 2- Principais DBPs formados pelos desinfetantes utilizados (23).	21
Tabela 3- Nomenclatura, massa molecular e abreviatura dos nove HAAs.	27
Tabela 4 - Características físico-químicas dos HAAs (31, 34, 40, 41).	29
Tabela 5 – Vários tipos de fibra, mecanismo de extração e polaridade do revestimento (adaptado de (65, 68, 71))	40
Tabela 6- Condições cromatográficas.	80
Tabela 7 - Programa de temperatura do forno do sistema cromatográfico.	81
Tabela 8- Condições do Espectrómetro de Massa.	81
Tabela 9 - Programa de aquisição dos dados no modo MS/MS, em ionização química	82
Tabela 10 – Condições de extração por HS-SPME.	83
Tabela 11- Fase móvel utilizada nas condições cromatográficas.	86
Tabela 12 – Volume adicionado de cada solução padrão primária e concentração dos HAAs na solução padrão conjunta.	89
Tabela 13- Volume adicionado de cada solução padrão primária e concentração de cada HAA na solução padrão conjunta para validação (SPCV).	90
Tabela 14 - Volume adicionado de cada solução padrão primária (SPP) e concentração de cada HAA nas soluções padrão de trabalho para validação (SPTV).	91
Tabela 15 - Níveis de fortificação usado para o estudo das recuperações na etapa de concentração da amostra.	92
Tabela 16- Níveis de fortificação para o estudo do efeito da matriz.	93
Tabela 17 - Condições previamente definidas para o espectrómetro de massa.	94
Tabela 18 - Condições cromatográficas otimizadas e utilizadas na validação do método.	98
Tabela 19 – Método criado no <i>software</i> do equipamento para análise dos compostos por UPLC-ESI-MS/MS.	99

Tabela 20- Tempos de retenção dos HAAs. ....	103
Tabela 21 – Ião precursor de cada HAA, obtido por electroionização.....	105
Tabela 22 - Ião precursor de cada HAAs obtido por ionização química.....	107
Tabela 23 – Resumo dos parâmetros do modo MS/MS para a deteção dos HAAs. ....	109
Tabela 24 – Tipos de iões precursores possíveis para os HAAs. ....	113
Tabela 25 – Ião precursor e respetivas voltagens de cone para cada HAA.....	114
Tabela 26 - Resumo das condições ótimas para definição das transições MRM1 e MRM2 para cada HAA.....	119
Tabela 27 – Gama de trabalho, equação da reta e coeficientes de determinação para os HAAs. ....	126
Tabela 28 - Resultados dos testes estatísticos para cada um dos compostos em estudo, nos estudos de linearidade.....	127
Tabela 29 - Limiares analíticos do método UPLC-ESI-MS/MS obtidos com base na reta de calibração e em condições de repetibilidade.....	128
Tabela 30 - Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho para cada um dos compostos em estudo.....	130
Tabela 31 - Estudos de precisão do método em condições de repetibilidade (n=10). ....	131
Tabela 32- Estudos de precisão intermédia do método. ....	131
Tabela 33- Recuperações médias obtidas em 2 níveis de fortificação, em água ultra pura. ....	135
Tabela 34 – Recuperação média e limites de quantificação do método para cada HAA, em água ultra pura.....	136
Tabela 35 - Recuperações médias de HAAs em 3 níveis de fortificação na água da torneira.....	138
Tabela 36 - Supressão iónica para os diferentes HAAs em água da torneira fortificada por injeção direta. ....	139
Tabela 37 – Recuperações médias e limites de quantificação global do método.....	140
Tabela 38 – Análise de HAAs em várias amostras por ULPC-ESI-MS/MS.....	141
Tabela 39 - Incerteza expandida do método para cada HAA obtida pela primeira abordagem. ....	143

Tabela 40 - Incerteza expandida do método para cada HAA obtida pela segunda abordagem.....	144
Tabela 41 – Limites de quantificação do método expressos com base nas incertezas. .....	144
Tabela 42- Custos associados ao método SPME-GC/ITMS. ....	171



## Símbolos e Abreviaturas

a – Ordenada na Origem

$A_{100}$  – Área do pico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

$A_i$  – Área do pico correspondente a uma determinada concentração

b – Declive da reta de calibração

BCAA – Ácido bromocloro acético

BDCAA – Ácido bromodicloroacético

CDBAA – Ácido clorodibromoacético

CID – Energia de colisão induzida

CI – Ionização Química

$C_f^\infty$  – Concentração de equilíbrio do analito no revestimento

$C_h^\infty$  – Concentração de equilíbrio do analito no *headspace*

$C_s^\infty$  – Concentração de equilíbrio do analito na matriz

$C_M$  – Concentração na fase móvel

$C_S$  – Concentração na fase estacionária

$C_{100}$  – Concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

$C_i$  – Concentração correspondente à área  $A_i$

CE – Comunidade Europeia

CV – Coeficiente de Variação

$D_f$  – Coeficiente de difusão

DBAA – Ácido dibromoacético

DPBs – Subprodutos de desinfecção

DCAA – Ácido dicloroacético

DL – Decreto-Lei

EI – Electroionização

ESI – Ionização por *electrospray*

ETA – Estação de Tratamento de Água

$F$  – Valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher

GC – Cromatografia gasosa

$H$  – Altura equivalente a um prato teórico

HAAs – Ácidos haloacético

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

ISO – Organização Internacional de Normalização

$K$  – Constante de distribuição

$k$  –factor de capacidade

$k_1$  – Razão de partição do primeiro pico

$k_2$  – Razão de partição do segundo pico

$K_D$  – Constante de distribuição

$P_{o/w}$  – Coeficiente de partição octanol-água

$K_{fs}$  – Constante de distribuição revestimento/amostra

$L$  – Comprimento da coluna

LC – Cromatografia líquida

LLE – Extração líquido-líquido

LoD – Limite de deteção

LoQ – Limite de quantificação

MBAA – Ácido monobromoacético

MCAA – Ácido monoclouroacético

MRM – Operação em modo SIM no primeiro e terceiro quadrupolo

MRM1 – Transição de quantificação

MRM2 – Transição de qualificação

MS – Espectrometria de massa

MS/MS – Espectrometria de massa *tandem*

$m/z$  – Razão massa carga

$n$  – quantidade do analito adsorvido pela fibra

$N$  – Número de pratos teóricos

NOM – Matéria orgânica natural

PCQA – Plano de Controlo de Qualidade da Água

$R^2$  – Coeficiente de determinação da reta

PG – Valor teste (teste de homogeneidade de variâncias)

$R_s$  – Resolução

$s$  – Desvio padrão

$s^2$  – Variância

$S$  – Sensibilidade



$s_a$  – Desvio padrão da ordenada na origem, a

$s_b$  – Desvio padrão do declive da recta, b

$s_N$  – Desvio padrão associado à média de N valores

$s_{xo}$  – desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com

$s_{y/x}$  – desvio padrão residual da curva de calibração

$s_{y/x}$  – Desvio padrão residual da função de calibração linear

$s_{y/x(2^\circ)}$  – Desvio padrão residual da função de calibração não linear de 2º grau

SIM – Monitorização seletiva de iões

SPCEL – Solução padrão conjunta para estudos de linearidade

SPCIC – Solução padrão conjunta para injeção cromatográfica

SPCV – Solução padrão conjunta para validação

SPE – Extração em fase sólida

SPERM – Solução padrão para estudo do efeito de matriz

SPECA – Solução padrão da etapa de concentração da amostra

SPII – Solução padrão individual para infusão

SPHIC – Solução padrão individual para injeção cromatográfica

SPME – Microextração em fase sólida

SPP – Solução padrão primária

SPEP – Solução padrão para o estudo da precisão

SPTV – Solução padrão de trabalho para validação

$t$  – Variável t de Student

$t_e$  – Tempo de equilíbrio

$t_m$  – Tempo morto

$t_r$  – Tempo de retenção

$t_r'$  – Tempo de retenção ajustado

TBAA – Ácido tribromoacético

TCAA- Ácido tricloroacético

THMs – Trihalometanos

TOC – Carbono orgânico total

$u$  – Velocidade linear da fase móvel

$u_{exp}$  – Incerteza associada a ensaios de recuperação (efeito de matriz)

$u_{prec}$  – Incerteza associada à precisão

$u_{recta}$  – Incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração

$u_{total}$  – Incerteza expandida do método

UPLC – Cromatografia líquida de ultra resolução

$V_f$  – Volume do revestimento

$V_h$  – Volume de headspace

$V_s$  – Volume da amostra

VT - Valor teste para o estudo de funções lineares

W – Largura da base do pico

WHO - Organização Mundial de Saúde

$x_i$  – Concentração de cada um (i) dos  $N$  padrões de calibração

$\bar{x}$  – Valor médio das concentrações dos padrões de calibração

$y'$  – Área estimada com base na equação da reta

$\bar{y}$  – Média de valores de  $y_i$

$y_i$  – Valores individuais de sinal instrumental

$\bar{y}_i$  – Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração

$\bar{y}_{i2}$  – Sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração  $x_i$  – Valores individuais de concentração

$\alpha$  – Factor de separação ou selectividade

## **Introdução**

A água é um bem essencial para a subsistência do homem. No entanto, a disponibilidade da água potável depende de vários fatores, sendo o clima de cada zona do planeta um dos fatores determinantes (1).

A qualidade da água destinada à produção de água para consumo é definida com base em critérios de saúde pública. Desta forma, existe legislação nacional que fixa os principais parâmetros da qualidade da água a observar, de forma a garantir a qualidade da água para consumo humano (2).

As características físico-químicas e organoléticas da água são conferidas por substâncias nela dissolvida. Para além destas características físico-químicas, que devem obedecer a limites estabelecidos por lei, a água deve ser bacteriologicamente pura, isto é, deve estar isenta de micro-organismos patogénicos (2).

A água é o meio preferencial para o desenvolvimento de diversos micro-organismos, sendo muitos destes nocivos à saúde humana. Isto faz com que a água seja um meio apropriado de propagação de várias doenças, caso não seja assegurada a sua qualidade em termos microbiológicos. Neste sentido, é importante recorrer à sua desinfeção de forma a garantir que esteja isenta de micro-organismos (3).

Desta forma, é importante promover um tratamento adequado da água antes de entrar no sistema de abastecimento, por forma a garantir o seu consumo com segurança, isto é, com as características que satisfaçam as normas de qualidade estabelecidas (2).

O tratamento da água tem como principal objetivo remover as substâncias indesejáveis e os micro-organismos patogénicos e, quando apropriado, também deve remover algumas impurezas, que embora possam não ser prejudiciais para a saúde humana podem tornar a água organolepticamente imprópria para beber (4).

O processo de desinfeção é uma etapa crucial no processo de tratamento da água, no entanto nesta etapa pode ocorrer a formação de subprodutos de desinfeção. A utilização dos desinfetantes químicos permitiu, de facto, uma melhoria significativa da qualidade de vida e uma diminuição da mortalidade. Contudo, muitos desses agentes, por serem fortes oxidantes, podem formar subprodutos de desinfeção. Apesar destes subprodutos de desinfeção se encontrarem em pequenas

concentrações, podem apresentar efeitos adversos na saúde do homem. O cloro é o desinfetante mais utilizado devido as suas qualidades como desinfetante e aos baixos custos que a sua utilização implica.

Os compostos estudados neste trabalho, os ácidos haloacéticos (HAAs), fazem parte dos subprodutos de desinfecção (DBPs, *Disinfection by Products*), da água que podem ser formados no processo de desinfecção utilizando como reagente de desinfecção o cloro. Estes compostos são o segundo maior grupo formado durante a etapa de desinfecção. Os HAAs apresentam diversos efeitos toxicológicos, sendo por isso necessário tomar medidas com o objetivo de controlar a quantidade destes subprodutos de desinfecção das águas tratadas de forma a garantir uma qualidade adequada.

O Laboratório Central da EPAL executa a análise em rotina dos HAAs, por GC-EDC, após um processo de extração líquido-líquido seguido de uma reação de derivatização. Devido à falta de robustez do método de ensaio, o tempo elevado de ocupação do técnico e a baixa rentabilidade de amostras realizadas diariamente, dado que se trata de um método não automatizado, levou à tentativa de implementação de uma nova metodologia para análise dos HAAs na água de consumo.

Após a análise da pesquisa bibliográfica efetuada, verificou-se que os HAAs em amostras de água podem ser analisados por GC-ITMS, usando como modo de preparação de amostra a microextração em fase sólida (5, 6). A escolha da metodologia analítica SPME-GC/ITMS tem a vantagem da possibilidade de automatização do processo de análise, aumentando a rentabilidade do número de amostras analisadas.

Posteriormente, após uma nova pesquisa bibliográfica verificou-se que os HAAs em amostras de água também podem ser analisados por UPLC-MS/MS. Nesta metodologia não é necessário uma etapa prévia de preparação da amostra sendo possível a injeção direta da amostra no equipamento de análise (5, 6).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a implementação e validação de um método analítico que permita a identificação e quantificação dos HAAs presentes em amostras de água de consumo.

## **Capítulo 1 – Tratamento da Água**

### **1.1. Origens da Água de Consumo**

O Homem utiliza a água, no seu dia a dia, para inúmeras situações, domésticas e industriais. Neste sentido, para compensar a deficiência do escoamento nos cursos de água em relação às necessidades da sua utilização, torna-se indispensável dispor de reservas naturais (lagos e lagoas) ou artificiais (albufeiras) que armazenem a água em excesso nos períodos húmidos e a forneçam nos períodos secos (1).

A água torna-se disponível através de infraestruturas que permitem a sua distribuição aos consumidores através de um sistema de abastecimento público. Dependendo da sua origem, a água captada para produção de água destinada ao consumo humano pode ser subterrânea ou superficial.

De um modo geral, a água de origem subterrânea possui uma melhor qualidade do que a água de origem superficial, pelo facto de se encontrar mais protegida, ou seja, menos sujeita à poluição (1).

Neste sentido, as empresas gestoras do sistema de abastecimento de água tendem a escolher locais onde o caudal e a qualidade da água sejam superiores, para que os custos do tratamento da água sejam reduzidos.

#### **1.1.1. EPAL**

O presente trabalho, foi desenvolvido no Laboratório Central da Direção de Controle de Qualidade da EPAL (Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.), a qual é uma sociedade anónima de capitais integralmente públicos, detida a 100% pela AdP – Águas de Portugal.

É responsável pela gestão do sistema de captação, tratamento, transporte e abastecimento da água a cerca de 2,9 milhões de pessoas em trinta e três municípios, incluindo a cidade de Lisboa (7).

O sistema de abastecimento de água destinada ao consumo humano é constituído pelo sistema de produção, que inclui o conjunto de todas as captações, as

estações de tratamento, o sistema de adução e transporte e o sistema de abastecimento.

Na figura 1, encontra-se representado o sistema de abastecimento de água da EPAL.



**Figura 1-** Esquema representativo do sistema de Abastecimento de água da EPAL.

O sistema de abastecimento de água da EPAL é constituído por duas captações superficiais, Albufeira de Castelo de Bode e a captação de Valada Tejo, e é também constituído por várias captações subterrâneas, a nascente dos Olhos de Água, os poços das Lezírias, Valada, OTA e Alenquer (8).

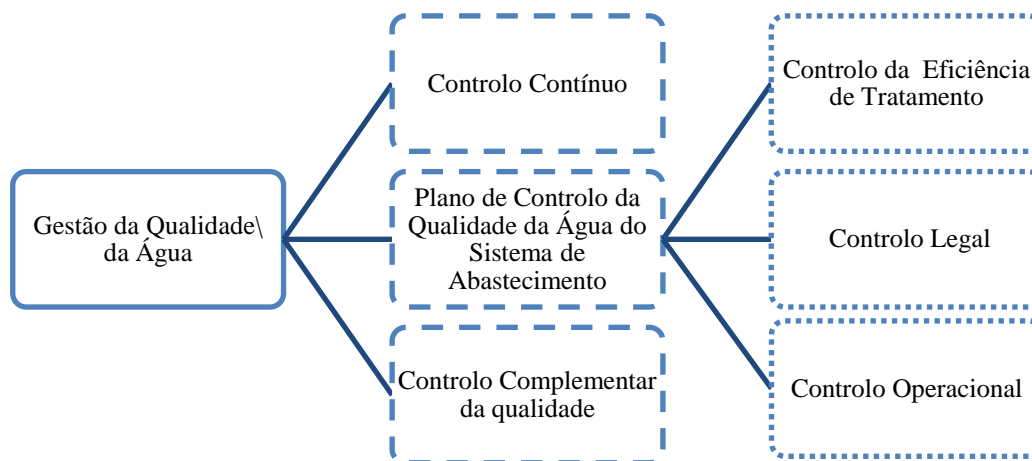
Tendo por base o último relatório de qualidade da água apresentado pela EPAL (7), o volume total de água captada em 2010 atingiu os 243 milhões de metros cúbicos, dos quais 219 milhões tiveram origem nas captações de águas superficiais, o que representa cerca de 90% do total de água captada.

O relatório da Qualidade da Água da EPAL de 2010 indica que 67% de água captada teve como origem a albufeira do Castelo do Bode, enquanto que 24% foi obtido na captação de Valada no Rio Tejo.

Independentemente do local e tipo de captação, a água captada é submetida a um processo de tratamento, que varia consoante a sua qualidade. Em cada estação de tratamento de água (ETA), ocorre frequentemente ajustes ao processo de tratamento tendo por base a qualidade da água captada (8).

A EPAL tem como missão garantir a qualidade da água em toda a extensão do sistema de abastecimento, desde os recursos hídricos utilizados até à torneira do consumidor na cidade de Lisboa. O Laboratório Central é responsável pela execução de um programa anual de Plano de Controlo da Qualidade da Água (PCQA), ao longo de todo o sistema de abastecimento. Na figura 2, encontra-se um esquema representativo da gestão de qualidade da água de abastecimento aplicada pela EPAL (8).

Esta atividade tem por objetivo fundamental verificar o nível de qualidade da água para consumo humano em toda a extensão do sistema de abastecimento e detetar atempadamente possíveis anomalias, ocasionais ou de carácter sistemático, de modo a permitir que sejam postas em prática medidas preventivas eficazes (8).



**Figura 2** - Esquema da Gestão da Qualidade da Água de Abastecimento aplicada pela EPAL.

Os compostos estudados neste trabalho estão incluídos no controlo operacional estabelecido no PCQA da EPAL.

## **1.2.Tratamento da Água**

O processo de tratamento de água destinada ao consumo humano constitui normalmente um desafio à adaptação operacional das estações de tratamento, uma vez que a qualidade das águas captadas é variável. O conjunto de operações, a que se designa por tratamento convencional, é constituído pelas seguintes etapas: armazenamento, gradagem, microtamização, pré-oxidação, arejamento, coagulação/floculação, sedimentação, filtração, outros processos, estabilização e desinfecção final (2, 9).

O tratamento convencional de água para consumo humano deverá permitir que, ao longo das diversas etapas, os fatores de contaminação químicos e microbiológicos sejam reduzidos.

De seguida, faz-se uma descrição resumida destes procedimentos que, isolados ou em conjunto, podem ser utilizados no tratamento da água em função das suas características.

### **1.2.1. Armazenamento**

A etapa de armazenamento procura evitar variações bruscas na qualidade da água, como por exemplo, devido às cheias. Normalmente, a água bruta é bombeada da captação para grandes reservatórios de armazenamento (10). O armazenamento da água em reservatórios cria condições favoráveis para a auto purificação da água armazenada, pode causar alterações indesejáveis na qualidade da água (11).

Os benefícios associados ao armazenamento estão relacionados com a redução da turvação e redução de agentes patogénicos através da ação da luz, levando a uma diminuição das substâncias indesejáveis e oxidação das impurezas. Por outro lado, de forma negativa, o armazenamento da água leva à formação de algas (4).

### **1.2.2. Gradagem**

Antes do início das etapas de tratamento propriamente ditas, na ETA, a água bruta passa através de uma série de grelhas, que tem como objetivo a remoção de



sólidos grosseiros, evitando assim a obstrução da conduta do respetivo sistema de tratamento (12).

### **1.2.3. Microtamização**

A etapa de microtamização tem como objetivo a remoção de sólidos finos bem como algas presentes na água. Antes do tratamento, a água passa por um tambor constituído por uma rede metálica, com dimensões que podem variar entre 0,02 a 0,06 mm, praticamente imerso em água, que gira a uma determinada velocidade, de forma a eliminar as algas presentes (10, 11).

### **1.2.4. Pré-oxidação**

A etapa de pré-oxidação consiste no primeiro processo químico de tratamento de água, sendo normalmente efetuada imediatamente após a captação de água bruta.

Este processo tem como principal objetivo degradar a maior parte da matéria orgânica presente na água captada, por ação de uma reação de oxidação, e destruir ou inativar os micro-organismos patogénicos. De forma a garantir que o processo de oxidação seja eficaz, a quantidade do agente oxidante utilizado deve ser superior ao necessário. Assim, o agente oxidante é adicionado de modo a garantir uma concentração residual do agente oxidante na água (11).

### **1.2.5. Arejamento**

O processo de arejamento é normalmente utilizado em águas que apresentam baixo teor de oxigénio dissolvido, podendo esta etapa ser realizada através da introdução de ar comprimido. O arejamento melhora a qualidade da água, diminuindo a sua corrosividade devido à libertação de dióxido de carbono, com consequente aumento do pH (11).

Normalmente, a etapa de arejamento é feita, preferencialmente, em águas subterrâneas visto que estas apresentam um elevado grau de metais. Os metais, como o ferro e o manganês, são apenas solúveis em água com valores de pH inferior a 6,5 e na ausência de oxigénio. Neste sentido, o arejamento oxida os sais metálicos

solúveis, os quais passam a hidróxidos metálicos insolúveis por aumento do pH da água, sendo possível posteriormente a sua remoção na etapa de filtração (10, 11).

### **1.2.6. Coagulação/ Floculação**

Uma água de origem superficial apresenta, normalmente, valores relativamente elevados de turvação, resultado da presença de partículas de natureza coloidal. Estas partículas apresentam normalmente dimensões menores que 10  $\mu\text{m}$ . Estes colóides podem ser, por exemplo, constituídos por óxidos metálicos, proteínas de grandes dimensões e micro-organismos. As partículas finas em suspensão na água, como as partículas de lama e a matéria coloidal em água não assentam durante o processo de sedimentação. Algumas impurezas coloidais não sedimentam mesmo se a água estiver parada por um longo período de tempo (13).

O facto das partículas coloidais serem portadoras de carga elétrica superficial, torna difícil a sua remoção por ação da gravidade. Por esta razão, é necessário recorrer a um agente coagulante, de forma a provocar a desestabilização das partículas coloidais (coagulação) e a consequente agregação em flocos de grandes dimensões (floculação) separáveis por decantação (13).

Os principais coagulantes utilizados são os sais de ferro (cloreto de ferro (III) e sulfato de ferro (III)) e alumínio (sulfato de alumínio, hidróxido de alumínio e cloreto de alumínio). Com vista a melhorar a operação de floculação, ao nível da velocidade da reação e da qualidade do floco produzido, pode ser aplicado um coadjuvante da floculação, como os polímeros orgânicos sintéticos (poliacrilamidas, óxido de polietileno e o ácido poliacrílico), que devido às suas longas cadeias moleculares atuam por um mecanismo de formação de pontes interpartículas (4, 12, 13).

A eficácia do processo de coagulação/floculação depende de vários fatores: a qualidade e a natureza do coagulante, alcalinidade da água e a temperatura da água.

A adição de sais de alumínio em águas alcalinas faz com que ocorra a formação dos iões  $\text{Al}^{3+}$ , que neutralizam as partículas coloidais (negativas) favorecendo assim a sua coagulação e levando à formação de hidróxido de alumínio. Estes compostos são insolúveis levando à formação de precipitados, permitindo assim uma coagulação mais forte.

Após o processo de destabilização das partículas, ocorre a sua aglomeração o que leva à formação de flocos. Este processo pode ocorrer de duas formas: movimento browniano (floculação pericinética), ou seja, uma floculação natural, ou pela utilização de forças externas (floculação ortocinética) de forma a promover o contacto dessas partículas.

O tamanho das partículas a flocular pode interferir com o tipo de processo que pode ocorrer. Se as partículas apresentarem um tamanho inferior a 1  $\mu\text{m}$  a floculação pericinética é muito lenta. Neste caso deve-se recorrer à floculação ortocinética, que consiste em provocar turbulência na água utilizando, por exemplo, pás mecânicas (13, 14).

### **1.2.7. Sedimentação**

A sedimentação é a operação unitária que é utilizada para eliminar as impurezas cuja densidade específica é superior à da água. Quando a água se encontra em movimento essas impurezas permanecem em suspensão devido à turbulência existente. A remoção dos flocos formados no processo de coagulação/floculação é possível através da sua sedimentação por ação da gravidade. Os flocos vão se acumular no fundo do tanque de sedimentação e constituir as lamas do processo de tratamento. Trata-se de uma operação que permite reduzir o teor de certos parâmetros da água, como a turvação, a cor, o ferro, o manganês, as algas, a dureza e a matéria orgânica, conferindo-lhe uma melhor qualidade para ser posteriormente filtrada (16, 18, 19).

Os fatores que influenciam a sedimentação incluem o tamanho, a forma e peso dos flocos, a viscosidade e a temperatura da água, o tempo de permanência da água na bacia de sedimentação, entre outros (4).

### **1.2.8. Filtração**

A filtração é um processo físico-químico que tem como finalidade a separação de impurezas em suspensão da água, que não foram removidas durante a etapa de sedimentação (13). Neste ponto, a água contém apenas sólidos finos ( $< 10 \text{ mg/L}$ ) e material solúvel, sendo necessária a sua remoção. Os filtros são constituídos por camadas de areia e cascalho de forma a garantir uma remoção eficiente. A

eficiência dos filtros vai depender de fatores como a carga poluente da água, o tamanho e a forma do meio filtrante, e o fluxo de água através do filtro (13).

O processo de filtração é constituído pelas seguintes ações:

— Esforço mecânico - as partículas em suspensão, presentes na água que são de tamanho maior do que os espaços vazios existentes nas camadas de areia, são retidas. A camada de areia pode ficar obstruída depois de algum tempo, pelo que deve ser limpa quando tal sucede.

— Sedimentação - os pequenos espaços vazios na areia atuam como tanques de sedimentação e a matéria coloidal que fica presa é uma massa gelatinosa que atrai outras partículas finas sendo também removidas pela sedimentação.

— Metabolismo biológico - determinados micro-organismos estão presentes nos espaços vazios da areia, decompondo a matéria orgânica (como algas, etc.), eliminando assim algumas das impurezas da água.

— Mudança de eletrólito - de acordo com a teoria da ionização, um filtro ajuda na purificação da água alterando as suas características químicas. Os grãos de areia do meio filtrante e as impurezas da água têm carga elétrica de natureza oposta que se neutraliza, forçando as partículas a assentar por gravidade (13).

O processo de filtração pode ser lento ou rápido, dependendo da granulometria do material filtrante utilizado e da própria configuração da unidade de filtração. A filtração rápida, por sua vez, pode ser gravítica ou em pressão, consoante os filtros sejam abertos ou fechados (15).

### **1.2.9. Outros Processos**

#### **1.2.9.1. Remoção de Ferro e Manganês**

A presença do ferro e manganês na água de consumo confere um gosto desagradável à água, mancham os tecidos durante as lavagens e provocam a formação de precipitados nas condutas de distribuição da água.

A sua remoção é feita através de um processo de oxidação, que transforma as formas solúveis de metais ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ) em formas insolúveis ( $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mn}^{4+}$ ). Isto pode ser realizado na etapa de arejamento, por adição de reagentes de oxidação, tais

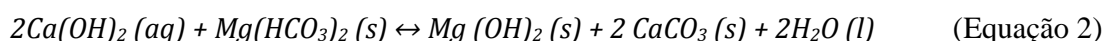
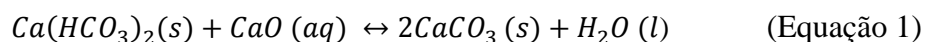
como, o cloro, o hipoclorito de sódio, o dióxido de cloro e o ozono, ou por passagem através de filtros oxidantes (15, 16). Os óxidos formados são insolúveis e precipitam, podendo ser posteriormente filtrados.

#### 1.2.9.2. Amaciamento

O processo de redução ou eliminação da dureza da água designa-se por amaciamento. As águas podem ser classificadas de acordo com o seu teor em carbonato de cálcio: águas muito duras ( $\geq 300$  mg/L), águas duras (150 – 300 mg/L), águas moderadamente duras (75-150 mg/L) e águas macias ( $\leq 75$  mg/L) (13). O valor da dureza da água não deve ser superior a 100 mg/L, sendo necessário recorrer ao amaciamento, que consiste na eliminação parcial ou completa dos iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (9, 16).

O amaciamento pode ser executado por meio da utilização de dois processos:

— Através do processo de amaciamento por precipitação converte os sais solúveis em insolúveis pela adição de reagente (cal, carbonato de sódio, soda cáustica), à água, sendo estes removidos por sedimentação, promovendo a formação de precipitados de carbonato de cálcio e de hidróxido de magnésio (16):



— A permuta iónica consiste em fazer passar a água por uma resina permutadora de iões que retira os iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . A regeneração da resina é feita por uma solução concentrada de NaCl (9).

#### 1.2.10. Estabilidade

Ao longo do processo de tratamento de água, podem ocorrer alterações do valor de pH pelo que, sempre que necessário, deverá ser feito o seu ajuste.

As alterações de pH da água podem provocar danos diversos. No caso da água apresentar um pH baixo, poderá levar à corrosão da tubagem do sistema de

abastecimento. Se a água apresentar um valor de pH alto, poderá levar à deposição de sais na tubagem de distribuição levando à sua obstrução (11).

Quando as águas apresentam valores baixos de pH estes podem ser corrigidos, normalmente recorrendo a duas alternativas: fazer passar a água por um leito de brita calcária, que vai fazer com que ocorra a eliminação do dióxido de carbono em excesso sob a forma de hidrogenocarbonatos solúveis. Uma das outras alternativas é pela adição de cal ou carbonato de sódio. No caso da água apresentar altos valores de pH, pode recorrer-se a vários mecanismos nomeadamente, recarbonatação, adição de ácido carbónico, ou pela adição de ácido sulfúrico ou clorídrico (16).

### **1.2.11. Desinfecção**

A etapa de desinfecção tem como objetivo a destruição de micro-organismos patogénicos capazes de originar doenças.

Todos os desinfetantes químicos utilizados no tratamento de água produzem sempre algum tipo de produto secundário. A eficiência do processo de desinfecção é controlada por diversos fatores, nomeadamente: tipo de desinfetante e a concentração adicionada, tempo de contacto, pH da água, temperatura, tipo de micro-organismos e respetiva concentração (11, 17, 18).

Um desinfetante apropriado para uma dada estação de tratamento, deve ter determinados características. De um modo geral, as características de um desinfetante são as seguintes (4, 13, 17) :

- Deve inativar os organismos patogénicos
- Atuar num curto período de tempo
- Ser inofensivo para o Homem
- Não deve conferir odor nem sabor à água
- Permitir uma ação desinfetante residual
- O seu custo não deve ser elevado.

São várias as substâncias que atuam como desinfetante e cada uma tem as suas vantagens e desvantagens em relação às outras. Os desinfetantes mais usados são o cloro, ozono, dióxido de cloro, cloraminas e a radiação ultravioleta (19).

Em seguida encontra-se uma breve descrição dos possíveis desinfetantes utilizados.

#### **1.2.11.1. Radiação Ultravioleta**

A radiação ultravioleta, emitida por uma lâmpada de baixa ou média pressão, pode ser utilizada para a inativação de protozoários, bactérias, bacteriófagos, leveduras, vírus, fungos e algas. A turvação da água pode inibir a desinfecção com este tipo de radiação. A radiação ultravioleta pode agir como catalisador em reações de oxidação, quando usada em conjunto com ozono ou peróxido de hidrogénio (4).

Este método, quando executado corretamente é eficaz contra bactérias e vírus, dependendo do comprimento de onda usado e do tempo de exposição (17).

#### **1.2.11.2. Ozonização**

O ozono possui um elevado poder oxidante e é utilizado muitas vezes no processo de tratamento de água, promovendo a oxidação de substâncias químicas orgânicas. O ozono reage com a matéria orgânica natural (NOM, *Natural Organic Matter*), de forma a aumentar a sua biodegradabilidade.

O ozono é formado a partir da passagem de ar ou oxigénio por um campo elétrico de alta voltagem, e é adicionado diretamente à água. Para evitar o crescimento bacteriano indesejado no sistema de abastecimento, a ozonização é usada em associação com a filtração biológica ou com o carvão ativado, com o objetivo de reduzir a cor, cheiro, sabor e a presença de micro-organismos na água (4, 17).

A formação de subprodutos da desinfecção, quando se usa o ozono como agente oxidante, é inferior à quantidade de subprodutos formados no processo de cloração, no entanto, quando o ozono é utilizado em águas que contenham brometos, conduz à formação de bromatos. A Organização Mundial de Saúde considera que os bromatos apresentam propriedades genotóxicas e carcinogénicas quando presentes na

água, pelo que o uso de ozono como agente de desinfecção da água, apresenta alguns riscos para a saúde do consumidor (4, 13, 17).

### **1.2.11.3. Cloro e Derivados**

#### **1.2.11.3.1. Cloragem**

Na desinfecção por cloragem recorre-se, tipicamente, à utilização de um de três agentes oxidantes: cloro gasoso ( $\text{Cl}_2$ ), hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ), ou hipoclorito de cálcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ). A escolha do reagente a utilizar é feita em função da quantidade necessária de desinfetante, das condições existentes no local, da facilidade de operação, das condições de segurança e do custo associado.

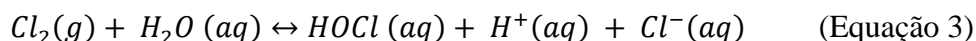
Normalmente utiliza-se o cloro gasoso quando se trata de grandes instalações (dado ser o produto mais económico), e o hipoclorito de sódio e o hipoclorito de cálcio quando se trata de instalações de pequena dimensão (dado ser o produto de mais simples utilização) (13, 20) .

O cloro é o reagente químico mais utilizado no processo de desinfecção, por diversos fatores:

- Inativação de micro-organismos patogénicos presentes na água, num intervalo de tempo relativamente curto
- O cloro não é tóxico para os seres humanos
- Baixo custo
- Produção de um residual de cloro relativamente baixo.

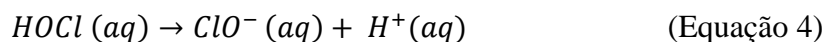
A cloragem é feita através da utilização de cloro gasoso liquefeito, solução de hipoclorito de sódio ou grânulos de hipoclorito de cálcio. Dependendo do tipo de substância/processo utilizado assim será feito o respetivo processo de desinfecção.

Quando o cloro é adicionado à água, ocorre a reação de hidrólise, dando origem a formação do ácido hipocloroso (4, 21).



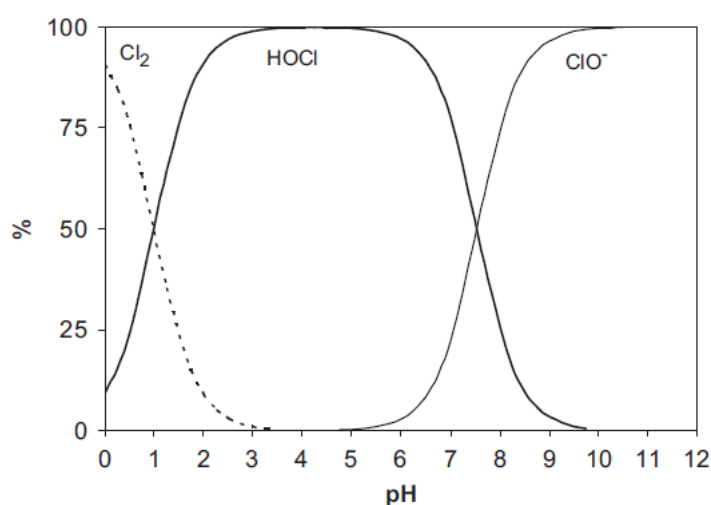


Dependendo do pH da água, ocorre a dissociação do HOCl formando-se  $\text{OCl}^-$ , segundo a reação da equação 4:



Tanto o HOCl como o  $\text{OCl}^-$ , podem atuar como desinfetantes embora o ácido seja cerca de oitenta vezes mais eficaz do que o ião hipoclorito (21).

Como se pode verificar na figura 3, a quantidade de HOCl e  $\text{OCl}^-$  varia em função do pH da água.

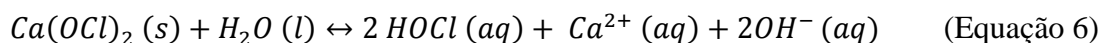
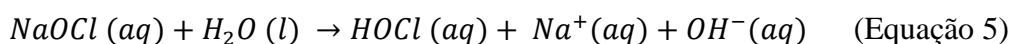


**Figura 3** – Distribuição das espécies de cloro na água em função do pH (adaptado de (21)).

Por análise da figura 3, verifica-se que a valores pH baixos ( $\text{pH} \leq 5$ ) a presença do ácido hipocloroso é dominante. A um pH superior a 6 a concentração do ácido hipocloroso diminui e aumenta a concentração do ião hipoclorito. Neste sentido, quanto mais baixo for o pH da água mais eficaz será a desinfecção (21).

É necessário uma adição em excesso de cloro para garantir que a água tenha um valor de cloro residual suficiente para que seja possível a destruição de todos os micro-organismos presentes na água. No entanto, o excesso de cloro é necessário uma vez que, em muitas situações, ocorre um consumo de cloro superior ao esperado. Isto sucede dado que, em paralelo, existe uma rápida combinação do cloro com compostos redutores e compostos orgânicos insaturados presentes nas águas naturais (12).

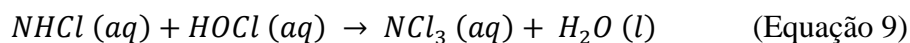
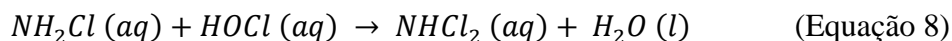
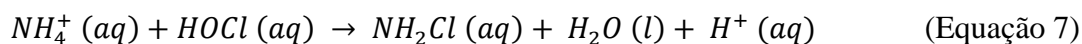
O cloro pode ser adicionado ainda sob a forma de hipoclorito de sódio (NaOCl) e hipoclorito de cálcio (Ca(OCl)<sub>2</sub>). Estes compostos são agentes oxidantes alternativos ao cloro gasoso podendo ser utilizado na fase de pré-oxidação, e são normalmente utilizado quando a água a tratar não necessita de uma elevada quantidade de cloro, ou seja, quando a água a tratar apresenta uma qualidade considerada razoável. A equação 5 descreve a reação do hipoclorito de sódio com a água (13):



Apesar das enormes vantagens da utilização do cloro como produto de desinfecção, a utilização deste tem vindo a ser posta em causa. Uma das desvantagens da utilização de cloro, é a sua capacidade para reagir com a matéria orgânica natural, levando à formação de subprodutos de desinfecção halogenados, podendo ser controlada por otimização do sistema de tratamento (4).

#### 1.2.11.3.2. Cloraminas

As cloraminas (mono, dia e tricloramina) são produzidas pela reação do ácido hipocloroso com a amónia, como descrito pelas equações 7, 8 e 9 (12):



Destas, apenas as monoclорaminas são usadas como agente desinfetante, sendo um desinfetante menos eficaz que o cloro. Assim são utilizadas como desinfetante secundário, para a manutenção de um sistema de abastecimento residualmente estável uma vez que, a sua elevada estabilidade proporciona à água uma boa proteção contram os posteriores crescimentos bacterianos no sistema de abastecimento. Devido à sua fraca reactividade, este desinfetante origina

aproximadamente metade do teor de subprodutos de desinfecção organoclorados comparativamente aos produzidos com o cloro (4).

#### **1.2.11.3.3. Dióxido de Cloro**

O dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) tem sido utilizado nos últimos anos devido a preocupações com a produção dos subprodutos de desinfecção, associada à desinfecção com cloro livre. Normalmente, o dióxido de cloro é gerado imediatamente antes da sua aplicação, devido à sua fotossensibilidade em solução decompõe-se em os iões clorato ( $\text{ClO}_3^-$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) (4).

O dióxido de cloro tem como vantagem não oxidar o ião brometo a bromato ou a ácido hipobromoso, uma vez que estes reagem com a matéria orgânica, formando subprodutos de desinfecção bromados (2, 4).

### **1.3. Vantagens e Desvantagens dos Diferentes Tipos de Desinfetantes**

Desde a década de 50, que se conhece a eficácia da utilização do cloro na destruição e inativação dos micro-organismos patogénicos presentes na água. Ao longo dos anos tem surgido outros tipos de desinfetantes, tais como o dióxido de cloro, cloraminas, e o ozono. Para além destes agentes químicos, utilizam-se ainda processos não químicos, como a radiação ultravioleta.

A escolha de um desinfetante utilizado no tratamento da água está dependente de razões económicas e práticas, o principal motivo para a sua escolha é a sua eficácia como agente desinfetante e a formação de subprodutos indesejáveis derivados da sua ação oxidante.

A utilização da radiação ultravioleta tem tendência a aumentar devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, apresentando ainda pouca aplicação à escala industrial devido à sua baixa eficiência e segurança na inativação de micro-organismos existentes na água.

Em relação aos métodos químicos, a utilização do ozono está associada a custos elevados fazendo com que este composto seja um desinfetante menos comum, apesar de se tratar de um composto bastante eficiente na inativação de micro-organismos. O dióxido de cloro apresenta também elevada eficiência na inativação

de microrganismos. No entanto, envolve a formação de iões clorito e clorato, o que constitui a principal desvantagem para a sua aplicabilidade (17).

Na tabela 2, encontra-se um resumo das vantagens e desvantagens da utilização dos diferentes tipos de desinfetantes.

**Tabela 1-** Desinfetantes utilizados no tratamento de água para consumo humano  
(adaptado de (17)).

<b>Desinfetantes</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b><u>Cloro</u></b>	<p>Oxida ferro, manganês e sulfuretos.</p> <p>Controla a cor e sabor.</p> <p>Biocida eficiente.</p> <p>É o desinfetante mais barato, mais fácil de utilizar e mais conhecido.</p> <p>Permite ser utilizado como desinfetante residual.</p> <p>Pode ser utilizado na forma de hipoclorito de sódio e de cálcio.</p>	<p>Origina subprodutos halogenados e cloratos.</p> <p>Pode conferir cheiro e sabor à água.</p> <p>Menos eficiente em meio básico.</p> <p>Forma subprodutos biodegradáveis que podem promover o crescimento microbiano no transporte e distribuição.</p>
<b><u>Dióxido de cloro</u></b>	<p>Mais eficiente que o ácido hipocloroso e as cloraminas na inativação de vírus.</p> <p>Oxida ferro, manganês e sulfuretos.</p> <p>Menor formação de subprodutos halogenados.</p> <p>O poder desinfetante não é afetado pelo pH.</p> <p>Permite ser utilizado como desinfetante residual.</p>	<p>Formação de clorito e clorato.</p> <p>Menos económico.</p> <p>Decompõe-se sob a ação da luz solar.</p> <p>Deve ser produzido no local de aplicação.</p> <p>Pode dar origem a odores.</p>
<b><u>Ozono</u></b>	<p>Mais eficiente que o cloro, cloraminas e dióxido de cloro na inativação de vírus.</p> <p>Oxida o ferro, o manganês e os sulfuretos.</p> <p>Reduz a turvação.</p> <p>Controla a cor e o sabor.</p> <p>Requer pouco tempo de contacto.</p> <p>Na ausência de brometos não se formam subprodutos halogenados.</p> <p>Desinfecção não influenciada pelo pH.</p>	<p>Equipamento e gastos energéticos dispendiosos.</p> <p>É corrosivo e tóxico.</p> <p>Maior produção de subprodutos biodegradáveis que podem promover o crescimento microbiano durante o transporte.</p>
<b><u>Cloraminas</u></b>	<p>Menor formação de subprodutos halogenados.</p> <p>Permite ser utilizado como desinfetante residual.</p>	<p>Menor poder desinfetante que o cloro, o ozono e o dióxido de cloro.</p> <p>Não oxidam o ferro, o manganês e os sulfuretos.</p> <p>Menos eficientes a elevados valores de pH.</p>
<b><u>Radiação Ultravioleta</u></b>	<p>Eficiente na inativação de vírus e bactérias.</p> <p>Ausência da formação de subprodutos da desinfecção.</p>	<p>Pouco eficaz na inativação de Vírus.</p> <p>Eficiência diminuída pela turvação.</p>

#### **1.4. Tipo de Tratamento Utilizado nas ETAs da EPAL**

O processo de tratamento de uma água para consumo humano engloba várias etapas, as quais, dependem fundamentalmente das fontes de água selecionadas.

No caso concreto da EPAL, como já foi referido anteriormente a água de captação é maioritariamente superficial (90%). Este tipo de água, comparativamente com a água de captação subterrâneas, necessita de um tratamento mais complexo.

No entanto, podem existir diferenças significativas entre as características das águas superficiais, levando desta forma a alterações nas operações de tratamento das mesmas.

Em específico, as captações superficiais da EPAL (albufeira de Castelo do Bode a captação do rio Tejo em Valada), apresentam características bastante diferentes, sendo o processo de tratamento ajustado nas duas estações de tratamento.

Na Estação de Tratamento de Água da Asseiceira é utilizada a água captada na albufeira de Castelo do Bode, sendo maioritariamente água da chuva. O tratamento compreende as seguintes etapas: pré-cloragem de emergência, remineralização e correção da agressividade, coagulação/floculação química, flotação, ozonização intermédia, filtração, ajuste do pH, cloragem intermédia no canal de água filtrada e desinfecção final com cloro.

Na Estação de Tratamento de Água de Vale da Pedra é tratada a água captada no rio Tejo, em Valada. O processo de tratamento inicia-se junto à captação, onde tem lugar a macrotamização e a etapa de pré-cloragem I. Na ETA realizam-se as seguintes fases: pré-cloragem II, condicionamento do pH, coagulação/floculação, decantação, filtração, correção de pH e desinfecção final com cloro.

À água captada nos poços da Ota, Lezírias, Alenquer e Valadas é adicionado cloro gasoso. Estas origens poderão ser misturadas/diluídas com águas tratadas provenientes das estações de tratamento da Asseiceira e de Vale da Pedra.

A água captada na nascente do Olhos de Água é tratada por um sistema de radiação ultravioleta. Esta água tratada é posteriormente misturada/diluída com água proveniente de outras origens (8).

## 1.5. Formação de Subprodutos de Desinfecção

Como já foi referido, o processo de desinfecção é uma etapa crucial no processo de tratamento das águas de consumo. Independentemente das inúmeras vantagens do processo de desinfecção (DBPs), durante esta etapa ocorre a formação de subprodutos de desinfecção (22).

Os subprodutos de desinfecção podem ser divididos em subprodutos halogenados e não halogenados, sendo os primeiros a formar-se quando os compostos orgânicos da água reagem com o cloro, bromo e iodo livre (4, 19).

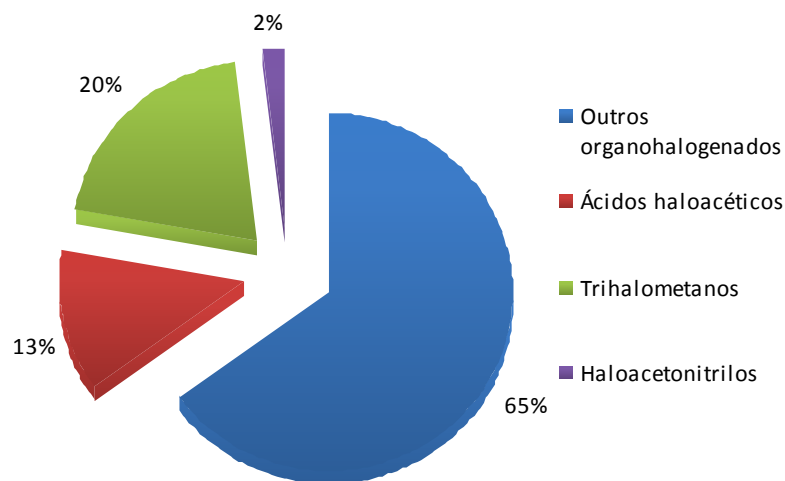
Na tabela 2, apresenta-se uma listagem dos principais DBPs, formados aquando da utilização dos diversos desinfetantes na etapa de tratamento.

**Tabela 2-** Principais DBPs formados pelos desinfetantes utilizados (23).

Cloro	Ozono	Dióxido de cloro	Cloroaminas
Trihalometanos			Trihalometanos
Ácidos haloacéticos			Ácidos haloacéticos
Acetonas halogenadas	Compostos inorgânicos	Compostos inorgânicos	Acetonas
Haloacetonnitrilos	Aldeídos e cetonas aldeídos	Ácidos carboxílicos	halogenadas
Aldeídos halogenados	Ácidos carboxílicos	Ácidos	Aldeídos
Álcoois halogenados	Fenóis aromáticos	Ácidos haloacéticos	halogenados
Ésteres halogenados	Álcoois, ésteres e alcanos	Acetonas	Haloacetonnitrilos
Amidas halogenadas	Nitrilos	halogenadas	Halonitrometanos
Aldeídos, cetonas e álcoois	Compostos heterocíclicos	Compostos aromáticos	Ésteres halogenados
Fenóis aromáticos		Aldeídos e ésteres	Álcoois
Ácidos carboxílicos			halogenados
			Amidas halogenadas
			Ésteres halogenados
			Fenóis halogenados

Apesar de se formarem vários DBPs durante o processo de desinfecção, quando se utiliza o cloro como agente de desinfecção, ocorre a formação maioritária dos seguintes grupos de DBPs: trihalometanos (THM), ácidos haloacéticos (HAAs) e haloacetonnitrilos (HAN) (5, 24, 29).

Os HAAs são o segundo grupo de DBPs gerados em maior abundância na etapa de desinfecção, como podemos ver pela figura 4 (15, 29, 31).



**Figura 4-** Proporção dos DBPs resultantes da cloração da água para consumo humano (adaptado de (19, 24)).

Como se pode observar na figura 4, a quantidade de DBPs de outros organohalogenados é cerca de 65% sendo este valor preocupante uma vez que ainda não é conhecida a origem de todos os compostos nem os efeitos sobre a saúde humana.

A formação dos DBPs ocorre, de um modo geral, devido às reações dos oxidantes com a matéria orgânica natural presentes na água, existindo também outros fatores que influenciam a formação dos DBPs.

A água bruta contém matéria orgânica composta por uma mistura heterogênea de substâncias, incluindo ácidos húmicos e ácidos fúlvicos. Os ácidos húmicos e fúlvicos são predominantes e constituem os principais precursores dos subprodutos formados através de reações com o desinfetante, como se descreve através da equação 10 (19):



As reações de formação dos subprodutos podem acontecer na estação de tratamento ou no sistema de distribuição. Uma vez que o cloro reage com a NOM, a aplicação de cloro, sempre que possível, deve ser realizada somente após os



processos de clarificação da água, para assegurar a remoção prévia de substâncias precursoras (19).

## **1.6. Fatores que Influenciam a Formação de DBPs**

A formação dos DBPs durante o processo de desinfecção da água é complexa e pode ser influenciada por vários fatores (24, 25).

### **1.6.1. Tipo e Dose de Desinfetante**

Numa mesma água, quanto maior for a quantidade de desinfetante adicionado, maior a quantidade de subprodutos formados (26). Além disso, com o aumento da dose de cloro, a quantidade de compostos orgânicos triclorados formados é maior do que a das espécies di e monocloradas. A quantidade de compostos orgânicos clorados é também superior à dos compostos orgânicos bromados (24, 26).

### **1.6.2. Temperatura, pH e Tempo de Contacto**

Devido à cinética do processo de formação, o aumento da temperatura durante os meses do verão pode causar um aumento do nível de DBPs nas águas. Além disso, durante os meses de verão, existe um maior nível de NOM e um aumento da taxa de crescimento microbiana. Para combater esses efeitos sazonais, concentrações mais elevadas de cloro são, por vezes, adicionadas durante o tratamento (24). A combinação destes fatores causa muitas vezes níveis substancialmente mais elevados de DBPs durante este período. No entanto, também pode ocorrer a diminuição de alguns HAAs, que se decompõem a elevadas temperaturas, levando à formação dos THMs.

O pH da água constitui outro fator que influencia a formação de subprodutos halogenados. Existe uma relação inversa entre a formação de HAAs e o aumento do pH. O aumento do pH leva ao aumento da produção dos THMs e a um decréscimo da formação dos HAAs (24, 27).

Como seria de esperar, com o aumento do tempo de contacto com o agente oxidante, também pode ocorrer um aumento na formação da maioria dos DBPs. A

concentração dos HAAs e dos THMs aumenta com o tempo de contacto. Por outro lado, as concentrações dos DPBs voláteis, como por exemplo os haloacetoneitrilos e as haloacetonas, diminuem à medida que aumenta o tempo de contacto (26).

### 1.6.3. Presença de Bromo

Se a água apresentar quantidades apreciáveis de brometos, o cloro poderá oxidar estes a ácido hipobromoso, o qual irá reagir com a NOM levando à formação de compostos organobromados (27). O ácido hipobromoso reage cerca de 25 vezes mais rápido do que o ácido hipocloroso e forma subprodutos de desinfecção por reação com a NOM. A razão de HOBr / HOCl desempenha um papel importante na formação dos THMs e HAAs (24).

### 1.6.4. Composição da Matéria Orgânica Natural da Água

O teor e natureza da NOM presente na água, são os fatores que mais influenciam a formação de subprodutos de desinfecção (27, 28). A NOM, medida pela quantidade de carbono orgânico total (TOC, *Total Organic Carbon*), é uma matriz complexa de material orgânico existente em águas naturais, tanto subterrâneas como superficiais. São várias as frações (hidrofóbicas e hidrofílicas) que constituem a NOM nomeadamente (29, 30):

Ácidos húmicos: Substâncias húmicas que precipitam a um valor de pH 1;

Substâncias hidrofóbicas ácidas: ácidos fúlvicos, ácidos carboxílicos alifáticos (C5-C9), ácidos carboxílicos aromáticos (1 e 2 anéis) e fenóis (1 e 2 anéis);

Substâncias hidrofóbicas alcalinas: proteínas, aminas aromáticas (1 e 2 anéis) exceto a piridina;

Substâncias hidrofóbicas neutras: mistura de hidrocarbonetos, álcoois alifáticos (> C5), amidas, ésteres, cetonas, aldeídos; ácidos carboxílicos alifáticos de longa cadeia (> C9), ácidos carboxílicos aromáticos (> 3 anéis) e aminas;

Substâncias hidrofílicas ácidas: ácidos carboxílicos alifáticos (< C5), ácidos carboxílicos polifuncionais, mistura de compostos com vários grupos ácidos e hidroxilo;

Substâncias hidrofílicas alcalinas: aminas alifáticas (< C9), aminoácidos, piridina, peptídeos;

Substâncias hidrofílicas neutras: aminas alifáticas, álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas (< C5) e polissacarídeos.

As reações entre a NOM e o agente desinfetante são normalmente reações de oxidação, em que ocorre a quebra das duplas ligações C=C, e/ou reações de substituição, em que num grupo funcional ocorre uma substituição por átomos de halogéneos (31).



## Capítulo 2 - Ácidos Haloacéticos

### 2.1. Notas Introdutórias

Os subprodutos de desinfecção em estudo neste trabalho são os ácidos haloacéticos. Estes compostos são derivados do ácido acético onde os hidrogénios do grupo metilo podem ser substituídos por cloro e/ou bromo. Dependendo do grau de substituição, ocorre a formação de diferentes HAAs. Na tabela 3, estão apresentados os nove HAAs que se formam durante o processo de desinfecção com cloro.

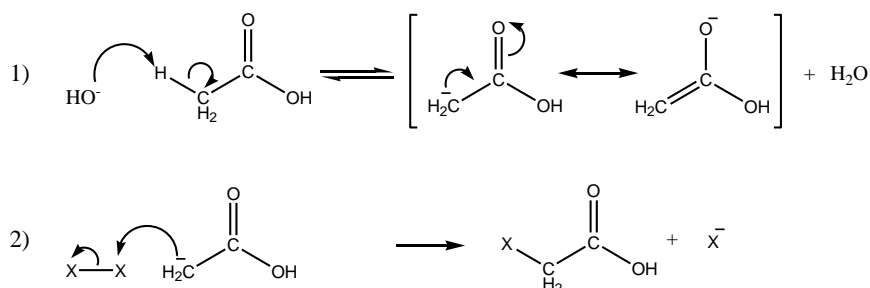
**Tabela 3-** Nomenclatura, massa molecular e abreviatura dos nove HAAs.

Ácidos Haloacéticos	Fórmula Química	Massa Molecular	Abreviatura
Ácido monocloraacético	$\text{ClCH}_2\text{COOH}$	94,5	MCAA
Ácido monobromoaacético	$\text{BrCH}_2\text{COOH}$	138,9	MBAA
Ácido dicloroaacético	$\text{Cl}_2\text{CHCOOH}$	128,9	DCAA
Ácido dibromoaacético	$\text{Br}_2\text{CHCOOH}$	217,8	DBAA
Ácido tricloroaacético	$\text{Cl}_3\text{CCOOH}$	163,4	TCAA
Ácido tribromoaacético	$\text{Br}_3\text{CCOOH}$	296,7	TBAA
Ácido bromocloroaacético	$\text{BrClCHCOOH}$	173,4	BCAA
Ácido clorodibromoaacético	$\text{ClBr}_2\text{CCOOH}$	252,3	CDBAA
Ácido bromodicloroaacético	$\text{BrCl}_2\text{CCOOH}$	207,8	BDCAA

O mecanismo de halogenação do ácido acético, apresentado na figura 5, ocorre pela substituição no carbono  $\alpha$ , podendo a reação ser catalisada por um ácido ou por uma base. Nas zonas de captação de águas superficiais, a água encontra-se em condições ligeiramente básicas (32) .

Na reação de halogenação ocorre primeiro a formação do enolato em meio alcalino e, de seguida, dá-se o ataque nucleofílico ao halogénio. Se houver um excesso de halogénio, ocorre uma substituição total dos hidrogénios  $\alpha$ . A deslocalização de carga, que ocorre com a substituição dos grupos halogenados, aumenta a acidez do hidrogénio  $\alpha$  levando a sucessivas desprotonações e à

enolização. Neste sentido, cada halogenação ocorre de forma mais rápida que a anterior (32).



**Figura 5-** Mecanismo de halogenação do ácido acético em meio básico. X=Cl ou Br  
(32).

## 2.2. Características Físico – Químicas dos Ácidos Haloacéticos

Os ácidos haloacéticos são ácidos carboxílicos que possuem grupos eletronegativos (halogénios), o que lhe confere um maior poder de acidez do que os ácidos não substituídos. A dissociação de um ácido carboxílico é um processo de equilíbrio, e qualquer fator que estabilize o anião carboxilato resulta num aumento da acidez. Por exemplo, um grupo eletronegativo ligado a um ião carboxilato deslocaliza a carga negativa, levando ao aumento da acidez. Desta forma, quanto maior a quantidade dos grupos eletronegativos (halogénios), presentes na estrutura de uma molecular maior será a acidez do composto.

Na tabela 4, encontram-se algumas as características físico-químicas dos diferentes HAAs.

**Tabela 4** - Características físico-químicas dos HAAs (31, 34, 40, 41).

Ácido Haloacético	pK <sub>a</sub>	log P <sub>O/W</sub>	Ponto de Ebulição (°C)
Ácido monocloroacético	2,86	0,22	189,3
Ácido monobromoacético	2,87	0,41	208
Ácido dicloroacético	1,25	0,92	194
Ácido dibromoacético	1,47	0,7	195
Ácido tricloroacético	0,63	1,33	196,5
Ácido tribromoacético	0,66	1,71	245
Ácido bromocloroacético	1,39	0,61	215
Ácido clorodibromoacético	1,09	1,62	263,6
Ácido bromodicloroacético	1,09	1,53	234,6

O pKa de um composto, corresponde à sua constante de acidez ou seja, quanto menor o valor do pKa maior a acidez do composto. O log P<sub>O/W</sub> designado como coeficiente de partição, é uma medida de solubilidade de compostos entre dois solventes, geralmente octanol e água.

Os ácidos haloacéticos são compostos polares e apresentam pontos de ebulição relativamente altos, sendo classificados como composto semivoláteis. Devido aos valores de pKa dos respetivos ácidos, estes compostos são considerados ácidos fortes e moderadamente fortes, dependendo do tipo de composto em causa. Apresentam uma elevada solubilidade em água.

### 2.3. Toxicologia dos Ácidos Haloacéticos

A utilização de cloro como agente desinfetante, leva à diminuição de doenças transmitidas pela água tais como, cólera, febre tifóide e disenteria reduzindo desta forma a mortalidade e morbilidade, no entanto a presença dos subprodutos de desinfecção na água de consumo é um problema de saúde pública que tem que ser controlado (33) (34) (35).

Estes compostos, podem entrar no corpo humano por diferentes meios, uma vez que a água potável, além de ser utilizada para beber, apresenta outras utilizações diárias, para cozinhar e na higiene pessoal (36).

Nos últimos anos tem aumentado o interesse pelo estudo da exposição do homem a compostos halogenados presentes em água de consumo humano, uma vez que existem toxicológicas que sugerem que alguns deles são possíveis carcinogénicos (4).

Vários estudos epidemiológicos revelaram haver uma associação entre a exposição aos DBPs e os efeitos na saúde.

Os efeitos para na saúde, associados com a exposição a ácidos haloacéticos, variam com o composto específico (37).

O MCAA é considerado como um composto improvável de ser carcinogénico, embora tenham sido observadas alterações no peso corporal, fígado, rins e testículos de ratos (4, 37).

O DCAA é considerado um provável carcinogénico para os seres humanos embora sem existir evidência, apenas se verificaram ligações entre a exposição ao DCAA e tumores hepáticos em ratos e ratazanas (4, 37, 38). Segundo estudos realizados este composto é neurotóxico em animais de laboratório e humanos, produzindo toxicidade neuromuscular, incluindo fraqueza dos membros e défice do andamento e equilíbrio físico e reflexo, tendo a neurotoxicidade aumentado com a exposição contínua (39).

O TCAA é considerado como um possível agente cancerígeno humano. Foram realizados estudos de exposição de ratos ao TCAA e verificou-se o aparecimento de tumores no fígado (40, 41), sendo ainda incerto se o mecanismo que causa estes tumores é relevante para seres humanos (4, 37)

Estudos em expuseram uma comunidade a HAAs apuraram que essa exposição está relacionada com um risco de redução de crescimento de crianças bem como com o pouco desenvolvimento do crescimento intra-uterino (42).

Devido à falta de dados o MBAA é inclassificável no que respeita à sua carcinogenicidade em seres humanos.

O DBAA é considerado como sendo provavelmente carcinogénico no ser humano, uma vez que estudos em animais mostraram ligações entre a exposição a DBAA e tumores em vários órgãos (37).

A natação pode ser uma importante via de exposição porque numa piscina os HAAs podem atingir elevados níveis de concentração (1-1000 ug.L<sup>-1</sup>)



comparativamente com os encontrados na água de consumo ( $1-100 \text{ ug.L}^{-1}$ ) (43). Gallego e a sua equipa, comprovaram a presença de HAAs em amostras de urina de nadadores e não nadadores e as concentrações encontradas depois da exposição à água dos nadadores está relacionada com a natação, tendo sido encontrados MCAA, DCAA e TCAA, em todas as urinas dos nadadores, estando estes resultados relacionados com os níveis de HAAs existentes na água da piscina (36).

## 2.4. Legislação em Vigor

A legislação aplicável às águas superficiais e subterrâneas, bem como às águas para consumo humano, abrange um elevado número de parâmetros organoléticos, físico-químicos e microbiológicos que permitem avaliar a qualidade da água.

O Decreto-Lei 236/98 de 1 de agosto (44), resulta da transposição da Diretiva 80/778/CE, de 15 de julho, e estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com o objetivo de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. O presente diploma é aplicado a águas para os seguintes fins: águas para consumo humano, águas para suporte da vida aquícola, águas balneares e águas de rega. De acordo com este Decreto-lei, a água para consumo humano não deve por em risco a saúde do consumidor, ser agradável ao paladar e à vista dos consumidores, e não causar a deterioração ou destruição das diferentes partes do sistema de abastecimento. Este Decreto-Lei não faz referência à monitorização de DBPs específicos, apenas indicando outros compostos halogenados no seu anexo VI relativo à qualidade da água para consumo humano.

O Decreto-Lei nº 103/2010 de 24 de setembro (45), revoga o Decreto-Lei 236/98 no que diz respeito a alguns parâmetros das águas superficiais, nomeadamente, cádmio, chumbo, hidrocarbonetos dissolvidos ou emulsionados, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, mercúrio, níquel, pesticidas totais, bifenilos policlorados, substâncias extraídas com clorofórmio. O presente Decreto-Lei procede à transposição para a ordem jurídica interna da Diretiva nº 2008/105/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro, relativamente a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água. De acordo com o Decreto-Lei, relativo às águas superficiais, este refere alguns compostos considerados como

contaminantes ambientais, que também são subprodutos de desinfecção da água de consumo. É o caso do diclorometano, pentaclorobenzeno, triclorobenzenos e clorofórmio.

O Decreto-Lei nº 243/2001 de 5 de setembro (46), pretende regulamentar a qualidade da água destinada ao consumo humano e transpõe para o direito interno a Diretiva nº 98/83/CE, do Conselho, de 3 de novembro, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. Este Decreto-Lei tem por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes de qualquer contaminação da água destinada ao consumo humano, e assegura a sua salubridade e limpeza. Este Decreto-Lei indica no seu anexo I a obrigatoriedade de analisar os THMs na água destinada ao consumo humano. O Decreto-Lei nº 243/2001 denomina que sempre que possível, deve ser reduzida a concentração em compostos organoclorados em água, sem que, no entanto se comprometa a desinfecção da água. Este Decreto-Lei foi revisto pelo Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de agosto (47), atualmente em vigor estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, tendo por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água e assegurar a disponibilização tendencialmente universal de água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada na sua composição. O presente decreto-lei estabelece ainda os critérios de repartição da responsabilidade pela gestão de um sistema de abastecimento público de água para consumo humano, quando a mesma seja partilhada por duas ou mais entidades gestoras.

A legislação nacional em vigor relativamente à qualidade da água para consumo humano não refere a monitorização dos HAAs.

A Agência de Proteção Ambiental Norte América (US EPA, *United States Environmental Protection Agency*), foi a primeira a estabelecer um valor máximo de contaminação para os HAAs na água de consumo: a soma de 5 HAAs (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA e DBAA), não deve exceder os  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ . Existem nove HAAs bromados e clorados, sendo apenas cinco regulamentados pela US EPA.

A US EPA classificou o DCAA no grupo B2 como provavelmente carcinogénico para o homem e o TCAA no grupo C, como um possível carcinogénico para o homem. De acordo com a EPA, pode haver um risco acrescido de cancro, como resultado do longo prazo de exposição ao consumo de água com

níveis de HAA que excedam o MCL (nível máximo de contaminação) definido por esta entidade (48, 49).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, *World Health Organization*), já apresenta valores guia para alguns HAAs, nomeadamente  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  para o MCAA,  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  para o TCAA e  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  para o DCAA. Relativamente aos HAAs bromados, os dados actualmente existentes são insuficientes para se avançar com algum valor guia (4).



## Capítulo 3 - Metodologias Analíticas

### 3.1. Nota Introdutória

As metodologias e técnicas utilizadas para a determinação de compostos em concentração vestigiais é de grande interesse, uma vez que permite a monitorização de compostos existentes na água, permitindo avaliar a qualidade da água.

Ao longo dos anos a técnica de extração líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*), foi a técnica com maior aplicação como técnica de preparação de amostras para os HAAs utilizada pela US EPA (50-52). A LLE apresenta algumas limitações devido à elevada utilização de solvente orgânico e apresenta um elevado tempo de preparação, pelo que não é um método automatizado.

Neste sentido, têm surgido novas técnicas de preparação de amostras com o objetivo de ultrapassar as limitações da LLE, técnicas de extração em fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction), (53, 54), e microextração em fase sólida (SPME Solid Phase Microextraction), (5, 6, 62-64), que se têm destacado como técnicas de preparação de amostra para a monitorização dos HAAs em amostras de água.

A análise cromatográfica é normalmente usada em todas as áreas da química analítica. Na identificação e quantificação dos HAAs as técnicas normalmente utilizadas são a cromatografia gasosa associada a um detetor de captura de eletrões e a um espectrómetro de massa (5, 6, 19, 45, 57, 58, 60-63). No entanto recentemente, foram publicados artigos para a análise dos HAAs usando a cromatografia líquida de ultra resolução associada à espectroscopia de massa (5, 6).

### 3.2. Preparação de Amostra – Microextração em Fase Sólida

#### 3.2.1. Nota Introdutória

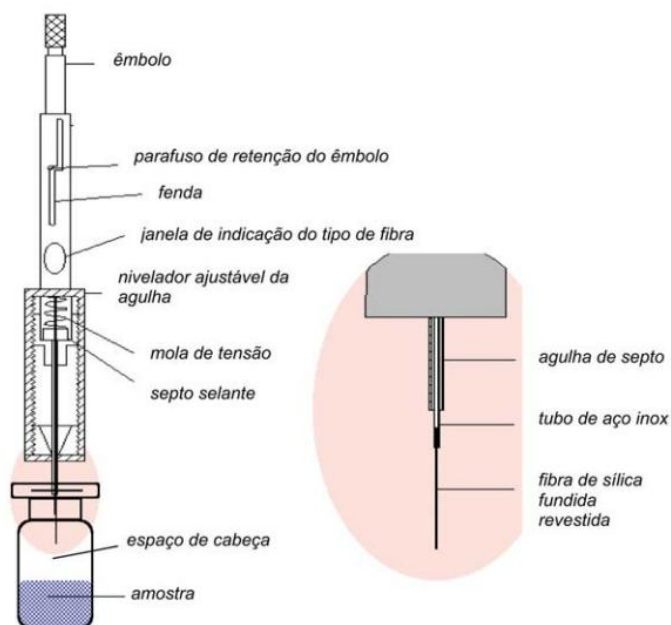
A técnica de microextração em fase sólida foi descrita, pela primeira vez, por Pawliszyn e colaboradores em 1987. A técnica foi introduzida para análise de compostos voláteis na área ambiental, mas tem vindo a ser desenvolvida para a

análise de uma grande variedade de matrizes, e para uma vasta gama de compostos voláteis e não voláteis (55, 56).

Por exemplo, numa forma de análise tradicional (LLE), de amostras de água, os analitos alvos são normalmente extraídos para um solvente orgânico, e a solução resultante é transferida para um equipamento analítico onde ocorre a separação, quantificação e identificação desse analitos. Cada um destes passos afeta a precisão e a velocidade da análise. O passo de preparação é moroso e muitas vezes utiliza um volume significativo de solventes orgânicos. A técnica de SPME foi desenvolvida para simplificar o passo de preparação de amostra essencialmente livre de solvente (56).

### 3.2.2. Processo de Funcionamento da SPME

Na técnica de SPME o processo de extração e pré-concentração dos analitos ocorre numa escala dimensional que não é das mais usadas. O dispositivo básico de SPME consiste numa fibra de sílica fundida, de 1 cm de comprimento, revestida por um polímero. Esta fibra está ligada a um êmbolo de aço inoxidável, o qual está instalado num suporte que se assemelha a uma seringa (55), como pode observar na figura 6.



**Figura 6-** Estrutura de uma seringa de SPME (adaptado de (57)).

O funcionamento da técnica de SPME é dividido em duas etapas:

Na primeira etapa, o revestimento da fibra é exposto por imersão na amostra, onde ocorre a partição dos analitos alvo entre a matriz da amostra e o revestimento da fibra (sistema de duas fases). Em alternativa, o revestimento da fibra pode ser exposto ao *headspace* (espaço de cabeça), da amostra, ocorrendo a partição dos analitos num sistema de três fases (56, 57).

Na segunda etapa, a fibra com os analitos concentrados é transferida para o equipamento analítico onde ocorre a desorção dos analitos, separação em coluna analítica, e quantificação dos analitos extraídos. A etapa de desorção é normalmente feita através da colocação da fibra dentro de um injetor quente num cromatógrafo gasoso (56, 57).

### 3.2.3. Princípios de Operação da SPME

A técnica de extração por SPME é um processo de equilíbrio multifásico: aquosa (amostra), polimérica (fibra) e gasosa (*headspace*). Durante a extração, num sistema trifásico, os analitos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido. Como a massa total do analito deve permanecer constante durante a extração, a conservação da massa no processo é apresentado pela equação 11:

$$C_0V_s = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s \quad (\text{Equação 11})$$

onde,  $C_0$  é a concentração inicial do analito na matriz;  $C_f^\infty$ ,  $C_h^\infty$  e  $C_s^\infty$  são as concentrações de equilíbrio do analito no revestimento, no headspace e na amostra, respetivamente;  $V_f$ ,  $V_h$  e  $V_s$  são o volume do revestimento, o volume de headspace, e o volume da amostra, respetivamente. Após rearranjos matemáticos, a quantidade de analito extraído depois de se atingir o equilíbrio do sistema é expresso pela equação 12:

$$n = \frac{K_{fs}V_fC_0V_s}{K_{fs}V_f + V_s} \quad (\text{Equação 12})$$

onde  $K_{fs}$  é a constante de distribuição revestimento/amostra. Com base na equação, a quantidade do analito adsorvido pela fibra ( $n$ ), após se atingir o equilíbrio, está linearmente relacionada com a concentração inicial do analito na amostra, permitindo assim, a análise quantitativa.

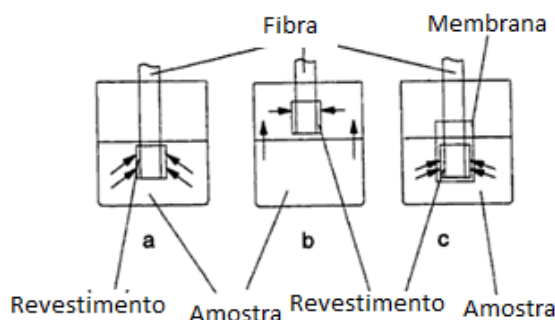
A sensibilidade do método é determinada pelo volume do revestimento, que também determina o tempo de equilíbrio. Neste caso, o tempo de equilíbrio,  $t_e$ , define-se como o tempo necessário para a extração de 95% da quantidade de um analito a partir da amostra, após se atingir o equilíbrio, e é dada pela equação 13.

$$t_e = t_{95\%} = \frac{2(b-a)^2}{D_f} \quad (\text{Equação 13})$$

Usando esta equação, pode-se estimar o menor tempo de equilíbrio possível para o sistema real por substituição dos coeficientes de difusão de um analito no revestimento ( $D_f$ ) e a espessura do revestimento da fibra ( $b - a$ ). Desta forma, o tempo requerido para o equilíbrio do analito entre a fase polimérica da fibra e a matriz da amostra depende apenas da espessura do revestimento da fibra e do coeficiente de difusão do analito na fibra (66, 67, 69).

### 3.2.4. Modo de Extração

A amostragem por SPME pode ser feita em três modos: extração direta, extração por *headspace* e extração com membrana de proteção. Pode-se observar na figura 7, as diferenças entre estes três modos de amostragem.



**Figura 7-** Modos de extração em SPME: extração direta (a); *headspace* (b); com a utilização de uma membrana protetora (c) (adaptado de (58)).



No modo de extração direta, o revestimento da fibra é inserido dentro da amostra e os analitos são transportados diretamente a partir da matriz da amostra para a fase extratora. Para facilitar uma extração rápida, é necessário algum nível de agitação para transportar os analitos para a vizinhança da fibra.

No modo de extração por *headspace*, os analitos são extraídos a partir da fase gasosa que está em equilíbrio com a matriz da amostra, ou seja, a fibra não está em contacto com a amostra. A principal razão para esta modificação, é para proteção da fibra de efeitos adversos causados por compostos não voláteis, substâncias com elevado peso molecular presentes na matriz da amostra (por exemplo, ácidos húmicos e proteínas). Este modo também permite modificações na matriz, incluindo o ajustamento de pH, sem que afete a fibra de SPME.

No terceiro modo de extração, com uma membrana protetora, a fibra de SPME é separada da amostra com uma membrana seletiva, a qual permite que os analitos atravessem a membrana enquanto bloqueia os possíveis interferentes. O objetivo principal do uso de uma membrana, protetora é proteger a fibra contra os efeitos causados por compostos com alto peso molecular quando são analisadas amostras sujas (58, 59).

### **3.2.5. Parâmetros Experimentais que Afetam a Eficiência de Extração**

Os parâmetros experimentais que influenciam a quantidade de analito extraído da amostra para o revestimento da fibra, são diversos. Em seguida, é feito um pequeno resumo dos respetivos parâmetros.

#### **3.2.5.1 Revestimento**

A afinidade dos analitos para o revestimento, é uma das principais variáveis a considerar para o sucesso da utilização do SPME. A regra de “igual dissolve igual” é aplicada nos revestimentos das fibras, ou seja, as suas características de polaridade descrevem as propriedades de um revestimento e a sua seletividade para os analito em estudo.

O volume do revestimento tem efeito na sensibilidade e na seletividade do método. Os revestimentos de maior espessura necessitam de tempos de extração mais elevados porque a difusão é lenta dentro do revestimento (60).

Na tabela 5, estão descritas as fibras de SPME, e consoante o tipo de revestimento de cada uma, o respetivo mecanismo de extração e a sua polaridade.

**Tabela 5** – Vários tipos de fibra, mecanismo de extração e polaridade do revestimento (adaptado de (65, 68, 71))

Fibra de SPME	Mecanismo de extração	Polaridade
Polidimetilsiloxano (PDMS), 7 µm/30 µm/100 µm	Absorção	Apolar
Poliacrilato (PA), 85 µm	Absorção	Polar
Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), 65 µm	Adsorção	Bipolar
Carboxen- polidimetilsiloxano (CAR-PDMS), 75 µm	Adsorção	Bipolar
Carbowax-polidimetilsiloxano (CW-DVB), 65 µm	Adsorção	Bipolar

### 3.2.5.2. Força Iónica

A adição de um sal numa solução pode ter diferentes efeitos sobre os analitos. Quando o sal é adicionado à solução, as moléculas de água formam esferas de hidratação ao redor dos iões de sal. Este efeito reduz a disponibilidade de moléculas de água livre para dissolver o analito. Desta forma, a concentração dos analitos na solução aquosa diminui e uma maior quantidade de analitos irão migrar para a fibra, de acordo com o efeito de *salting-out*. Por outro lado, como a concentração do sal aumenta em solução, este pode interagir com os analitos em solução através de interações eletrostáticas, reduzindo a capacidade do analito de migrar para a fibra, diminuindo desta forma a quantidade de analito extraído.

Desta forma, é razoável que haja no início um aumento na extração dos analitos com o aumento da concentração de sal, seguindo-se uma diminuição na extração devido às interações do sal com os analitos em solução (59).

### 3.2.5.3. Efeito do pH

As alterações do pH da amostra podem melhorar a sensibilidade do método para analitos ácidos e básicos, uma vez que, em SPME apenas são extraídas da água espécies neutras da água. Por ajuste do valor de pH, os ácidos e as bases fracas podem ser convertidos para as suas formas neutras, aumentando assim a sua extração pela fibra. A alteração do pH pode diminuir a solubilidade de alguns analitos. Compostos ácidos são extraídos mais facilmente a pH ácido e os compostos básicos a pH básico (58, 61).

### 3.2.5.4. Efeito da Temperatura

O aumento da temperatura aumenta os coeficientes de difusão dos analitos e, conseqüentemente, uma diminuição das constantes de distribuição dos analitos, o que conduz a um tempo de equilíbrio menor (55).

Utilizando o modo de extração direto, a técnica de SPME deve ser normalmente realizada à temperatura ambiente, uma vez que com o aumento da temperatura diminui a quantidade de analitos presentes na fase aquosa, com conseqüente diminuição da percentagem de analitos extraídos pela fibra. No caso de *headspace*, quanto maior a temperatura maior será a quantidade de analitos na fase de *headspace*, aumentando a percentagem de analitos disponíveis para serem adsorvidos pela fibra (58).

### 3.2.5.5. Agitação da Amostra

O processo de extração consiste na exposição da fibra de SPME a um pequeno volume de uma amostra aquosa ou ao *headspace* por um certo período de tempo. A agitação é normalmente usada para se atingir o equilíbrio de forma mais rápida, uma vez que aumenta a difusão do analito para a fibra (60).

Os métodos de agitação em SPME são os seguintes: agitação magnética, sendo necessário o uso de uma barra de agitação dentro do vial, e o uso de um *vortex*, em que o vial é movido rapidamente em movimento circular (55).

### 3.3. Cromatografia

#### 3.3.1. Nota Introdutória

O senhor Mikhael Semenovich Tswett foi considerado o pai da cromatografia moderna, através dos vários trabalhos experimentais que efetuou, particularmente na separação de extratos de plantas por adsorção diferencial em colunas, tendo verificado a nítida separação destes em bandas de diferentes cores ao longo de uma coluna. Neste sentido, o nome de cromatografia tem origem em duas palavras gregas *chroma* (cor) + *graphein* (escrita).

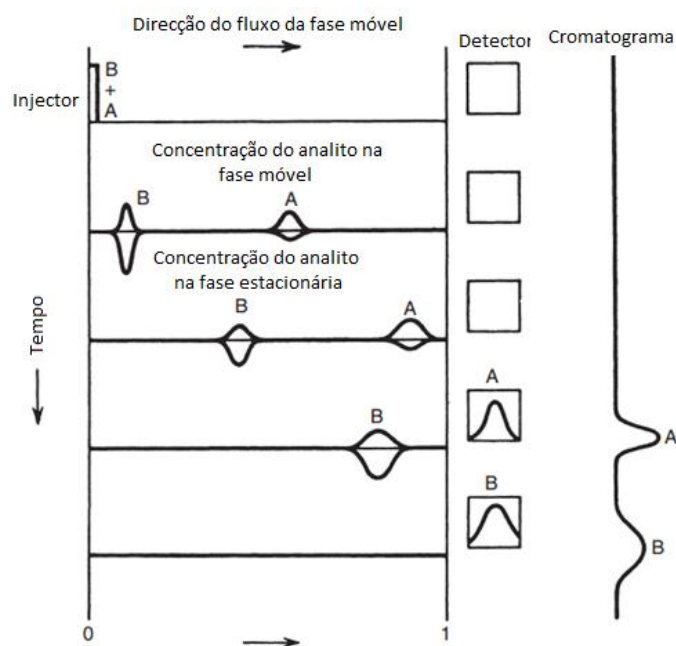
A descoberta da cromatografia foi um passo determinante no desenvolvimento do uso da adsorção como técnica em ciência de separação, tendo apresentado uma elevada importância em aplicações analíticas separativas, em diversas áreas científicas (62, 63).

#### 3.3.2. Princípios Teóricos

O objetivo de qualquer processo cromatográfico é a separação de analitos de uma mistura em compostos individuais. Existem diversas variáveis físico-químicas que influenciam a sua separação, sendo necessário a otimização de alguns dos parâmetros cromatográficos.

Todas as formas de cromatografia envolvem a partição dos compostos em análise entre duas fases diferentes. Os compostos são transportados por intermédio de uma fase móvel através de uma fase estacionária, movendo-se a velocidades diferentes, o que tem como consequência a sua separação física. A velocidade dos analitos ao longo da coluna depende da interação dos analitos com a fase estacionária (64).

Na figura 8, encontra-se uma representação esquemática do processo cromatográfico.



**Figura 8-** Esquema representativo do processo cromatográfico (adaptado de (65)).

As linhas horizontais representam a coluna cromatográfica, e cada linha é como um instante do processo num momento diferente. No primeiro instante, a amostra, que é composta por dois componentes A e B, é introduzida na coluna a partir do injetor. Existe uma partição dos componentes entre as duas fases, como se pode observar pelos picos distribuídos acima e abaixo da linha. Os picos apresentados acima da linha representam a quantidade de um componente particular na fase móvel, e os picos abaixo da linha representam a quantidade do componente na fase estacionária. Desta forma, o componente A tem uma maior distribuição na fase móvel, sendo assim, transportado ao longo da coluna a uma velocidade mais elevada que o componente B, que passa mais tempo na fase estacionária. Quando os componentes deixam a coluna passam através do detetor, dando origem a um cromatograma (65).

Existem uma série de conceitos teóricos básicos sobre os métodos cromatográficos, sendo necessária a sua compreensão para uma melhor aplicação da técnica.

### **Coefficiente de Partição**

No processo de separação cromatográfica, ocorre a partição do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Este equilíbrio é caracterizado pelo coeficiente de partição (K), que é definido pela razão entre as concentrações de um componente nas fases estacionária e móvel.

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad (\text{Equação 14})$$

onde  $C_S$  corresponde à concentração de um componente na fase estacionária e  $C_M$  diz respeito à sua concentração na fase móvel.

Quanto maior for o valor do coeficiente de partição de um componente, maior será valor de  $C_S$ , pelo que maior será a interação desse componente com a fase estacionária, ou seja, este componente move-se mais lentamente ao longo da coluna (64).

### **Fator de Capacidade**

O tempo que as moléculas passam na fase móvel é equivalente ao tempo de retenção de uma substância que não sofre qualquer interação com a fase estacionária, sendo designado por tempo morto,  $T_m$ . Para além deste tempo, as moléculas são retardadas no seu caminho pelas interações com a fase estacionária, levando a um tempo adicional  $T'_r$ , designado por tempo de retenção ajustado.

Desta forma, o tempo decorrido entre a entrada do composto na coluna cromatográfica e a deteção à saída é designado por tempo de retenção  $T_r$ , como podemos verificar na seguinte equação (64):

$$T_r = t_m + t'_r \quad (\text{Equação 15})$$

Neste contexto, o fator de capacidade é uma grandeza que mede o grau de retenção de um composto numa coluna cromatográfica, e pode ser calculado a partir da equação 16, desde que a velocidade do fluxo se mantenha constante (64).

$$k = \frac{t_r'}{t_m} \quad (\text{Equação 16})$$

### **Seletividade**

A seletividade,  $\alpha$ , de um sistema cromatográfico é uma medida do afastamento relativo entre dois picos adjacentes no cromatograma, podendo ser expressa a partir da seguinte equação 17:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{Equação 17})$$

onde  $k_1$  e  $k_2$  são os coeficientes de partição do 1º e do 2º pico, respetivamente. De acordo com esta definição, a seletividade tem sempre um valor superior à unidade (64).

### **Eficiência da Coluna**

A eficiência da coluna pode ser expressa em termos da altura equivalente de um prato teórico ( $H$  ou HEPT), e do número de pratos teóricos ( $N$ ), sendo expressa através da seguinte expressão 18:

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Equação 18})$$

onde  $L$  é o comprimento da coluna cromatográfica. Sendo a cromatografia um fenómeno de transferência de massa, a eficiência de uma coluna pode ser expressa pelo número de pratos teóricos,  $N$ . Este parâmetro traduz o valor da dispersão dos tempos de retenção para as moléculas de um dado soluto. Assim, para picos simétricos este parâmetro é dado pela equação 19:

$$N = 16 \times \left( \frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (\text{Equação 19})$$

Para os picos assimétricos a eficiência é dada pela equação 20:

$$N = 5,54 \times \left( \frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{Equação 20})$$

onde,  $W$  corresponde ao valor da largura do pico na base e  $W_{1/2}$  corresponde à largura do pico a meia altura.

Uma eficiência elevada é atingida com um numero elevado de pratos teóricos ( $N$ ), correspondentes a uma menor largura das bandas e, consequentemente permitindo uma melhor separação entre diversos picos. Por outro lado, a eficiência da coluna está inversamente relacionada com a altura dos pratos teóricos ( $H$ ) (65).

### **Resolução**

O objetivo das aplicações cromatográficas consiste na separação de todos os componentes de uma dada mistura. Outra medida da eficiência de uma coluna é a resolução. A resolução é um termo usado para expressar o grau de separação de dois picos adjacentes, que é dada pela equação 21:

$$R_s = 2 \times \frac{[(t_r)_B - (t_r)_A]}{W_A + W_B} \quad (\text{Equação 21})$$

A resolução é dada pelo quociente entre a diferença dos tempos de retenção ( $t_r$ ) e os valores médios das larguras dos picos ( $w_A$  e  $w_B$ ) ao nível da linha de base de dois picos adjacentes A e B.

A resolução pode ser também determinada relacionando o fator de capacidade, a seletividade e o número de pratos teóricos da coluna cromatográfica, através da expressão 22:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times \left( \frac{k_B}{1 + k_B} \right) \quad (\text{Equação 22})$$



Para um dado pico com formato gaussiano e com uma resolução superior ou igual a 1,5 ocorre a separação completa entre picos adjacentes.

A resolução poderá ser otimizada através das condições instrumentais adequadas, tal como o uso de uma coluna mais comprida, o que permite o aumento do número de pratos teóricos (65).

### **3.4. Cromatografia Gasosa**

#### **3.4.1. Nota Introdutória**

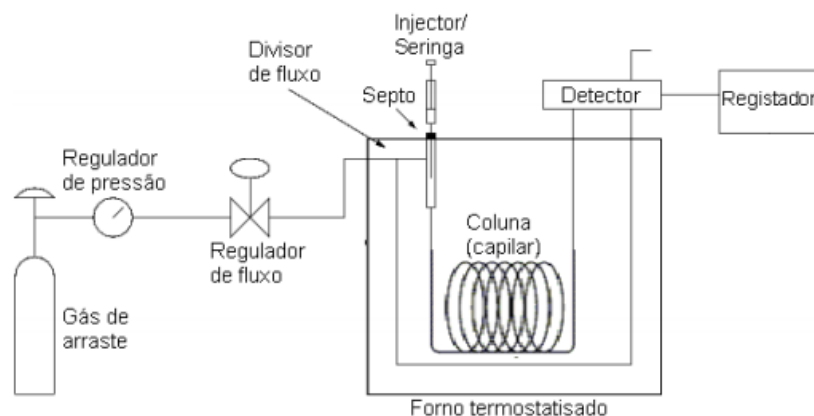
O conceito de cromatografia gasosa (GC, *Gas Chromatography*), foi introduzido pela primeira vez em 1941 por Martin e Synge. Neste tipo de cromatografia existe a partição do analito entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária

O primeiro cromatógrafo gasoso apareceu pela primeira vez em 1955. Desde então, a cromatografia teve uma evolução tecnológica elevada permitindo o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais sensíveis, automatizados e robustos.

A cromatografia gasosa é utilizada para a análise de compostos voláteis ou semivoláteis, tendo como requisito essencial a sua estabilidade térmica (66, 67).

#### **3.4.2. Cromatógrafo Gasoso**

Ao longo dos anos, verificou-se um avanço na tecnologia da GC, embora todos os equipamentos sejam semelhantes nos seus princípios base. Na figura 9, encontra-se uma descrição esquemática dos componentes básicos de um sistema de cromatografia gasosa.



**Figura 9** - Esquema de um cromatógrafo gasoso (adaptado de(66)).

Um sistema de GC é composto por seis componentes principais: gás de arraste, injetor, forno e coluna, detetor e um dispositivo de recolha/tratamento de dados.

A amostra é introduzida num injetor aquecido, onde volatiliza, sendo forçada pelo gás de arraste a entrar na coluna onde ocorre a separação dos diversos compostos existentes na amostra. No final cada composto passa no detetor, sendo os dados registados num computador.

#### 3.4.2.1. Gás de Arraste

O gás de arraste que é usado como fase móvel que transfere a amostra a partir do injetor, através da coluna, e para o detetor (68). O objetivo principal do gás de arraste é transportar a amostra através da coluna. O gás de arraste tem de apresentar determinados requisitos, nomeadamente, tem de ser inerte e não interagir quimicamente com a amostra. O objetivo secundário da utilização do gás de arraste é proporcionar uma matriz adequada para o detetor medir os componentes da amostra. Por isso, a escolha do gás de arraste depende, fundamentalmente, do tipo de detetor usado (65).

É importante que o gás de arraste apresente um elevado nível de pureza. A presença de impurezas nomeadamente de oxigénio e água podem atacar a coluna e destruí-la. Existem colunas que apresentam mais suscetibilidade que outras. Os gases

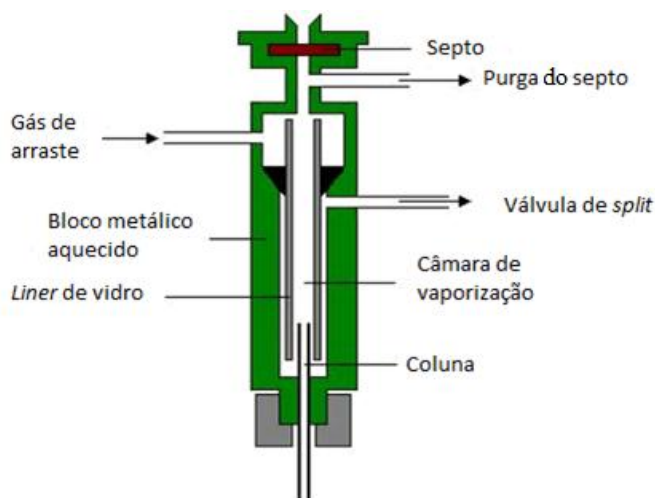
que normalmente são utilizados como fase móvel em cromatografia gasosa são o hélio (He), o azoto (N<sub>2</sub>), e o hidrogénio (H<sub>2</sub>) (66).

### 3.4.2.2. Sistema de Injeção

A introdução da amostra no GC é a primeira etapa do processo cromatográfico sendo de primordial importância, especialmente em GC, porque a sua eficiência reflete-se na eficiência global do processo de separação e dos resultados quantitativos (68).

Existem diversos tipos de sistemas de injeção, sendo que os mais utilizados operam frequentemente por vaporização isotérmica, com ou sem repartição de fluxo (*split/splitless*).

O injetor de *split/splitless* permite repartir a quantidade de amostra que chega à coluna capilar. Na figura 10, encontra-se uma representação esquemática de um injetor do tipo *split/splitless*.



**Figura 10** - Esquema de um injetor do tipo *split/splitless* (adaptado de (69))

Neste trabalho, utilizou-se um injetor deste tipo onde ocorre a injeção direta da amostra recorrendo ao uso de uma seringa, com um determinado volume. O injetor deve estar a uma temperatura adequada para volatilizar a amostra.

Neste tipo de injeção existem dois modos diferentes de utilização dependendo da configuração do injetor: *split* e *splitless*.

O modo de injeção *split* é muito utilizado quando a concentração de analito na amostra é relativamente elevada, pois apenas parte da amostra injetada entra na coluna, numa proporção previamente determinada, sendo a restante ventilada através da purga do *split*.

O modo de injeção *splitless*, é o inverso do *split*, isto é, a amostra é praticamente toda injetada na coluna. Ao injetar a amostra, a purga de *split* não se abre ficando fechada durante um certo período de tempo, e a amostra vaporizada entra na coluna. Depois da purga de *split* abrir, qualquer resto de amostra é rapidamente ventilada para o exterior. Este modo de injeção é muito utilizado quando a concentração de analito na amostra é baixa (66, 67).

### 3.4.2.3. Coluna e Forno

Existem dois tipos de colunas para GC, nomeadamente, as colunas de empacotamento e as colunas capilares. As colunas capilares são atualmente as mais utilizadas devido à sua elevada eficiência que oferecem, para resolução da maioria das amostras.

As colunas de empacotamento, são constituídas por um suporte sólido que é revestido por uma camada fina (0,05 a 1  $\mu\text{m}$ ) da fase estacionária líquida. Neste tipo de colunas o processo de separação é dependente do processo de difusão e do percurso irregular dos analitos em torno das partículas do suporte.

As colunas capilares são constituídas por um tubo de sílica fundida ( $\text{SiO}_2$ ), com um revestimento exterior em poliimida. Ao contrário das colunas empacotadas, nas colunas capilares a fase estacionária encontra-se distribuída das paredes internas do tubo sob a forma de um filme fino. As fases estacionárias mais comuns são constituídas por polisiloxanos, em que o tipo e a percentagem dos grupos substituintes diferenciam cada fase e ditam as características de polaridade, sendo a fase de polidimetilsiloxano, com características apolares, a mais vulgar.

A coluna cromatográfica encontra-se localizada num forno onde é programada a temperatura que permite a separação dos vários compostos, podendo operar no modo isotérmico ou usando um gradiente de temperaturas.

#### 3.4.2.4. Sistema de Detecção

Existem diferentes tipos de detetores o que permite a exploração de diferentes características da amostra. Um detetor ideal deve ser sensível, seletivo, estável, reproduzível e dar resposta linear numa gama alargada de concentrações para os analitos em estudo (65, 67).

Atualmente existem uma grande variedade de detetores para GC, podendo ser associada a outras técnicas analíticas, assumindo especial relevo a espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*).

### 3.5. Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massa

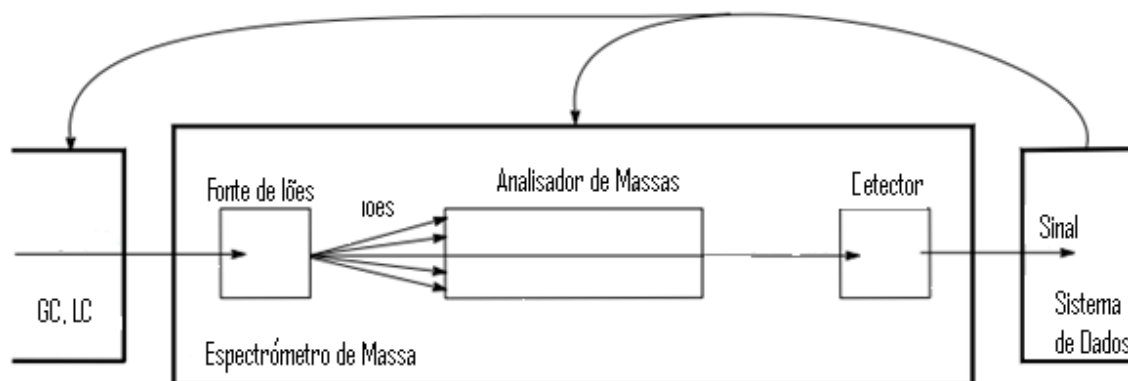
O acoplamento da cromatografia gasosa com a espectrometria de massa (GC-MS) é uma das denominadas técnicas hifenadas, uma vez que resulta da combinação de duas técnicas analíticas num só instrumento de análise. O princípio desta tecnologia consiste na separação dos componentes de uma mistura por GC e a caracterização de cada componente individual por MS.

A cromatografia gasosa é um excelente método de separação dos componentes de uma mistura complexa, no entanto esta técnica apresenta limitações no que diz respeito à identidade dos compostos separados. Por outro lado, a MS permite fazer análises qualitativas, ou seja, a identificação estrutural de diferentes analitos numa mistura, o que pode ser feito através da interpretação do espectro de massa obtido, que inclui o ião molecular de cada composto, na maioria dos casos, e os seus respetivos fragmentos.

O desenvolvimento tardio da técnica hifenada deve-se às incompatibilidades encontradas entre estas duas técnicas. A GC requer a utilização de um gás de arraste que flua através de uma coluna cromatográfica a pressão elevada, enquanto no MS a pressão tem de ser muito baixa, de forma a garantir que exista alto vácuo. Foi apenas com o aparecimento de interfaces adequadas de ligação entre os dois equipamentos que permitiu compatibilizar as pressões destas duas tecnologias (70).

### 3.5.1. Espectrometria de Massa

Um espectrómetro de massa é constituído por 3 componentes principais, cada um responsável por um passo do processo: a fonte de ionização, analisador de massas e o detetor, como se pode observar na figura 11.



**Figura 11** - Diagrama de funcionamento de um espectrómetro de massa (adaptado de (66)).

#### 3.5.1.1. Fontes de Ionização

A base da espectrometria de massa assenta na existência de iões que possam posteriormente ser analisados. Assim, é crucial a ionização da amostra. Tendo em vista que os processos de ionização são fundamentais para a MS, diversas fontes de ionização foram desenvolvidas ao longo da história.

O tipo de ionização a utilizar depende principalmente da energia interna transferida durante o processo de ionização e das propriedades físico-químicas do analito a ser ionizado.

Em seguida apenas detalhar-se-á as técnicas utilizadas nesta metodologia analítica (GC-MS).

#### Electroionização

O modo de electroionização (EI, *Eletro Ionization*) é uma das técnicas mais amplamente utilizada nos processos de ionização. A amostra entra na fonte de iões, onde as moléculas dos analitos vão interagir com um feixe de eletrões, altamente

energéticos, com um potencial de aproximadamente 70 eV. Este feixe de elétrons é proveniente do aquecimento de um filamento de tungstênio (71).

Quando as moléculas neutras provenientes do cromatógrafo gasoso colidem com os elétrons da fonte de ionização estes possuem uma energia suficiente para remover os elétrons das camadas mais externas dessas moléculas, gerando-se íons positivos e elétrons livres. A energia imposta neste tipo de ionização por norma é suficientemente grande para provocar a fragmentação da molécula inicial em outras moléculas neutras e fragmentos mais pequenos.

A limitação desta técnica é que, sob a voltagem utilizada, muitos destes íons moleculares formados inicialmente não resistem à fragmentação, pelo que a sua intensidade no espectro de massa pode ser reduzida ou mesmo inexistente em termos relativos. Os íons moleculares dão a informação sobre o peso molecular do composto e também podem ser extremamente importantes para a identificação do composto (70, 72).

### **Ionização Química**

Ao contrário da EI, em que as moléculas são ionizadas através da interação com elétrons altamente carregados, a ionização química (CI, *Chemical Ionization*) consiste em produzir íons pela colisão dos analitos com íons, provenientes de um gás reagente. Os reagentes normalmente utilizados são o metanol, metano, isobutano e amónia. O modo de ionização química é uma ionização mais suave e surgiu como uma forma encontrada para minimizar os efeitos da alta energia utilizada no EI (71).

No modo de ionização química como o gás reagente está presente em concentrações mais elevadas do que os analitos, as suas moléculas têm maior probabilidade de chocarem com o fluxo de elétrons e de perderem um elétron. As moléculas do analito são posteriormente ionizadas por meio da sua reação com íons do gás reagente. A maioria dos íons do gás reagente são fortes dadores de prótons, pelo que se formam moléculas protonadas, que apresentam uma massa de um valor maior do que a massa molecular do composto original (72).

### 3.5.1.2. Analisador de Massas

O conjunto de iões previamente formados são desviados, na direção do analisador de massa, onde são separados de acordo com a razão massa/carga ( $m/z$ ). Os analisadores de massa mais comuns são a armadilha de iões (*ion trap*), quadrupolo e tempo de voo (TOF, *Time-of Flight*).

O *ion-trap* é um quadrupolo tridimensional que aprisiona todos os iões que são introduzidos no seu interior. Este tipo de analisador é constituído por elétrodos, sendo que o central apresenta uma forma circular, e os dois da extremidade possuem uma geometria hiperbólica, o que permite criar um campo elétrico quadrupolar em 3D.

É este campo elétrico que mantém os iões numa órbita estável no seu interior, mantendo os iões aprisionados na *trap* quando é aplicada uma voltagem de radiofrequência (RF), os iões de uma determinada razão  $m/z$  ficam instáveis e são libertados da *trap*.

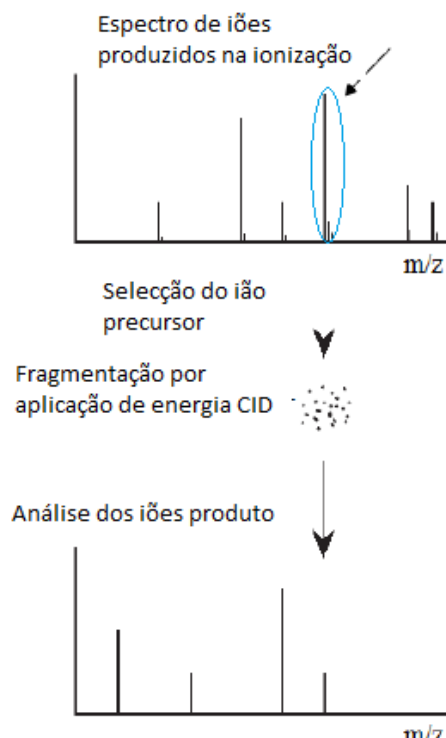
Devido à capacidade única de manter os iões aprisionados, este tipo de analisador é capaz de proporcionar diversos ciclos de fragmentação. No *ion trap* é possível trabalhar com vários modos de análise nomeadamente, *full scan*, SIM (*Selected Ion Monitoring*), e o modo MS/MS. No modo *full scan*, são efetuados varrimentos repetidamente numa gama de massas selecionadas e no modo SIM ocorre uma prévia seleção de dois ou três iões característicos de cada composto e apenas esses chegam ao detetor. Neste trabalho foi utilizado o modo MS/MS.

O modo MS/MS no *ion trap* é constituído por uma sequência de passos, que se encontra esquematizado na figura 12, que geralmente são: após a ionização dos analitos, o sistema isola um ião selecionado, também denominado de ião precursor, expulsando todos os outros da *trap*. Após a fragmentação do ião precursor, todos os iões que não são de interesse são levados à instabilidade de forma a serem eliminados da *trap*, sendo dirigidos para o exterior. De seguida, o ião precursor é fragmentado pela aplicação de uma energia de dissociação induzida por colisão (CID, *Colision Induced Dissociation*), formando diversos iões produto. Posteriormente, os iões de interesse de determinadas razão  $m/z$  (ião precursor e seus



fragmentos), tornam-se sequencialmente instáveis e são libertados da *trap* para o detetor, para gerar o espectro de massas (70).

Neste tipo de analisador, a seleção do ião precursor, a fragmentação e a subsequente análise dos iões é realizada na mesma parte do instrumento, de maneira que estes processos ocorrem separados apenas pelo tempo (70).



**Figura 12-** Princípio do funcionamento do modo *tandem* no *ion trap* (adaptado de (70)).

Neste sentido, a utilização da cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa no modo MS/MS mostra-se vantajosa, uma vez que por MS/MS é possível obter uma grande quantidade de informação estrutural acerca do analito, o que permite garantir a sua identificação com maior exatidão, comparativamente a outras técnicas de detecção cromatográficas. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica, através do modo MS/MS é possível detetá-los individualmente se possuírem massas moleculares diferentes. Desta forma, a seletividade do método é dada pelo espectrómetro de massa, quando usado no modo MS/MS.

### 3.5.1.3. Detetores

O detetor constitui a parte final do espectrómetro de massa. Após a separação os iões são transferidos para o detetor, o qual é geralmente um multiplicador de eletrões. O multiplicador de eletrões faz com que os iões ao entrarem no detetor sejam defletidos para um coletor, onde o sinal é multiplicado.

Existem dois tipos de multiplicadores de eletrões: dínodo discreto e o dínodo contínuo. Os multiplicadores do tipo dínodo discreto são constituídos por cerca de 12 a 20 dínodo, ligados eletricamente entre si, e são geralmente constituídos por cobre e berílio. Os multiplicadores do tipo dínodo contínuo são constituídos por uma superfície que funciona como um elétrodo contínuo.

Em ambos os detetores de iões, os iões colidem com a superfície interna do dínodo, e são refletidos, num processo que se repete várias vezes, e onde novos eletrões são libertados. Cada vez que o ião colide com o dínodo remove um eletrão da superfície do dínodo. No final, cada ião incidente pode ser amplificado na ordem de  $10^6$  a  $10^8$  (65).

## 3.6. Cromatografia Líquida

### 3.6.1. Nota Introdutória

Desde o início da cromatografia líquida (LC, *Liquid Chromatography*), em 1950, até aos dias de hoje, foram feitos muitos avanços e todos eles foram impulsionados pelo desenvolvimento contínuo de novas partículas de fase estacionária (73).

Nos últimos 40 anos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) tem sido a técnica analítica mais desenvolvida. O uso de partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ , em sistemas cromatográficos (HPLC), com pressões convencionais, diminui bastante o tempo de análise. Desta forma, o máximo de desempenho cromatográfico tem sido limitado pela pressão suportada pela coluna cromatográfica. Com o objetivo de eliminar o obstáculo da pressão surgiu a cromatografia líquida de ultra resolução (UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*), tornando a análise cromatográfica 20 vezes mais rápida

que a técnica de HPLC. Por outro lado, é um sistema capaz de trabalhar a pressões mais elevadas (73).

Na cromatografia líquida uma determinada mistura de compostos a analisar, passa através de uma coluna cromatográfica com um determinado enchimento e sob a ação de um eluente (fase móvel). Cada composto será eluído da coluna e registado na forma de um pico num cromatograma, a um determinado tempo de retenção.

Um sistema de cromatografia líquida é constituído por um reservatório de fase móvel, uma bomba, um injetor, uma coluna, um detetor e um sistema de recolha/tratamento de dados.

### 3.6.2. Cromatografia Líquida de Ultra Resolução

A UPLC resulta da combinação de uma coluna cromatográfica contendo partículas com aproximadamente 1,7  $\mu\text{m}$  de tamanho com uma tecnologia que permite o uso de líquidos a pressões elevadas (73).

A evolução ocorrida no desenvolvimento de fases estacionárias tem como base a equação de *Van Deemter*, que descreve a relação entre a velocidade linear da fase móvel ( $u$ ) e a eficiência do método cromatográfico, expressa pela altura do prato teórico ( $H$ ) (73, 74).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (\text{Equação 23})$$

O termo  $A$ , refere-se ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas do analito. O alargamento dos picos pode ser minimizado usando colunas de tamanho reduzido.

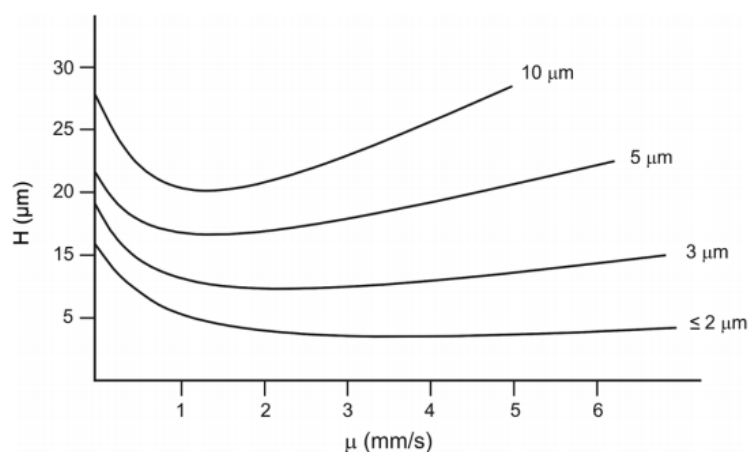
O termo  $B$ , está relacionado com a difusão axial ou difusão do soluto na fase móvel e este termo pode ser minimizado com o uso de velocidades lineares elevadas da fase móvel.

O termo  $C$ , descreve a transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária (74).

De acordo com a equação de *Van Deemter*, as partículas de menor tamanho reduzem a altura do prato e dessa forma são obtidas colunas com um maior número

de pratos, ou seja, colunas mais eficientes. A eficiência da coluna é proporcional ao comprimento da coluna e inversamente proporcional ao tamanho das partículas (75) (74).

Para partículas com valores inferiores a 2  $\mu\text{m}$ , a eficiência da coluna cromatográfica não diminui com o aumento da velocidade linear da fase móvel, ao contrário do que sucede com colunas cromatográficas contendo partículas de tamanho superior a 2  $\mu\text{m}$ . Neste sentido, este tipo de partículas pode ser usado para separações rápidas e ultra rápidas, permitindo uma maior resolução e diminuição do tempo de corrida (73, 74), como se pode observar na figura 13.



**Figura 13** – Curva de *Van Deemter* para partículas de 10, 5, 3 e  $\leq 2\mu\text{m}$  (adaptado de (73)).

Um aumento do número de pratos teóricos ( $N$ ) implica também uma diminuição da largura do pico, mostrando uma maior facilidade de separação dos picos. Dado que a largura do pico é inversamente proporcional à altura do pico, pode-se inferir que a diminuição do tamanho das partículas e consequentemente, o aumento da resolução estão relacionados com um aumento da sensibilidade, teoricamente 2 a 3 vezes maior num sistema de UPLC do que num HPLC. De referir que a deteção por MS é significativamente melhorada pela UPLC, uma vez que a redução da dispersão cromatográfica a baixas velocidades de fluxo, promovem a eficiência da ionização e consequentemente, aumentam a sensibilidade.

A diminuição do tamanho das partículas provoca um aumento na pressão do sistema, segundo a equação 24 (73, 75):

$$P = \phi \times \frac{L\eta u}{100d_p^2} \quad (\text{Equação 24})$$

Onde,  $P$  é pressão,  $\phi$  a resistência ao escoamento,  $L$  o comprimento da coluna (mm),  $\eta$  a viscosidade da fase móvel (mPa/s),  $u$  a velocidade linear (mm/s) e  $d_p$  o tamanho da partícula ( $\mu\text{m}$ ).

Tendo por base a interpretação da equação anterior, se o tamanho da partícula for reduzido para metade, a pressão irá aumentar para um fator de 4. Sendo assim, o uso de partículas com diâmetros menores está associada a colunas de menor comprimento, e o aumento da pressão não será 4 vezes maior, mas, mesmo assim, atingirá valores que não são compatíveis com o sistema de HPLC (73).

Para tirar proveito do aumento da resolução, de uma velocidade e sensibilidade superior proporcionada pelas partículas mais pequenas ( $\leq 2 \mu\text{m}$ ) é necessário uma tecnologia diferente da existente no HPLC. As modificações principais num sistema de UPLC são as seguintes (73-75):

- Uma bomba capaz de impulsionar a fase móvel de forma suave e reprodutível que possa compensar a compressibilidade do solvente que funcione em ambos os modos de separação isocrático e de gradiente.
- Detetores com elevada taxa de aquisição de forma a conseguir capturar um número suficiente de dados que permita a integração de um pico do analito de forma reprodutível, dado que este pico pode ter uma largura de pico a meia altura menor que 1 segundo.
- A introdução da amostra também é crítica, pois as convencionais válvulas de injeção, automatizadas ou em modo manual, não são projetadas para trabalhar a pressões extremas, de forma a proteger a coluna de flutuações de pressão deste tipo. Paralelamente houve a necessidade de desenvolver injetores precisos com capacidade para injeção de volumes pequenos, de forma a evitar a dispersão da amostra, o que levaria ao alargamento do pico cromatográfico, e a evitar o fenómeno de *carry-over*, condições também obrigatórias para aumentar a sensibilidade.

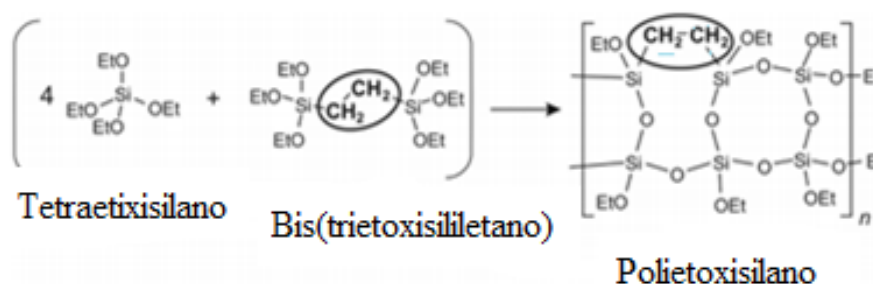
— A utilização de colunas com partículas  $\leq 2\mu\text{m}$  como material das colunas cromatográficas aumenta a resistência ao fluxo da fase móvel, pelo que estas colunas necessitam de operar a pressões mais elevadas. Neste sentido, é necessário a utilização de colunas com uma boa resistência mecânica que resistam a valores de pressão de pressão elevados, que consigam ser estáveis numa grande gama de pH, e com mínimas interações indesejáveis com os compostos a analisar.

### 3.6.3. Tipos de Colunas de UPLC

Atualmente, vários fabricantes têm desenvolvido colunas com dimensões adequadas para UPLC. Um dos tipos de colunas que possui as características necessárias para trabalhar em UPLC são as ACQUITY<sup>MT</sup> UPLC BEH fabricadas pela Waters.

Estas colunas foram desenvolvidas com o objetivo de dar resposta às necessidades impostas pela UPLC. Como já foi referido anteriormente, a necessidade de colunas com resistência mecânica levou ao desenvolvimento de partículas híbridas (orgânicas e inorgânicas) que são muito mais resistentes que as partículas de sílica (73).

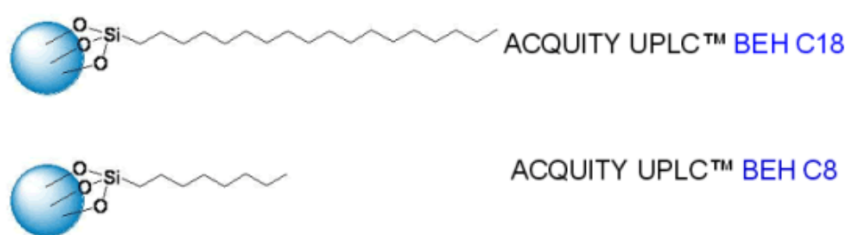
Este tipo de partículas foi produzido pela reação de bis(trietoxisililetano) e tetraetoxisilano, originando uma partícula de sílica com pontes de etano inseridas na sua estrutura, como podemos observar a da figura 14.



**Figura 14** - Sílica híbrida de segunda geração utilizada na fase estacionária das colunas de UPLC (adaptado de (73)).

É a combinação do material orgânico e inorgânico que dá origem a partículas que possuem uma maior estabilidade mecânica. Esta estabilidade é conferida pelas ligações silício-carbono que são semelhantes as ligações silício-oxigênio. Este tipo de ligação apresenta uma elevada resistência numa gama alargada de pH (1-12), sendo esta estabilidade a variações de pH conferida pelas pontes de carbono que estão inseridas na superfície da sílica. Estas partículas são também estáveis a temperaturas até 60 °C e fornecem uma boa simetria de pico, devido à quantidade reduzida de silanóis residuais (73).

Encontram-se disponíveis no mercado vários tipos de colunas ACQUITY UPLC<sup>MT</sup> BEH, com diferentes características. Na figura 15, encontram-se apresentados dois tipos de fase estacionária utilizadas em colunas de UPLC.



**Figura 15** – Fase estacionária das colunas ACQUITY UPLC<sup>TM</sup> BEH (Adaptado de (74)).

As colunas BEH C18 e C8 são consideradas colunas universais de escolha para a maioria das separações de UPLC fornecendo estabilidade a uma grande gama de pH. São recheadas com fase estacionária contendo cadeias alquílicas ligadas à superfície da sílica, de forma a estabelecer uma melhor estabilidade hidrolítica. As fases estacionárias com cadeias C8 são menos hidrofóbicas (74).

### 3.7. Cromatografia Líquida associada à Espectrometria de Massa

O sucesso de qualquer técnica analítica depende não somente da informação proporcionada, mas também da fiabilidade e da robustez da sua aplicação. Nos últimos tempos, a técnica de LC-MS tornou-se uma ferramenta indispensável em

diversas áreas de aplicação, uma vez que fornece alta sensibilidade, segurança e produtividade. Além das diversas características apresentadas, outra característica importante desta técnica é a análise direta, sem necessidade de derivatização dos analitos.

O LC-MS combina a capacidade de separação física da cromatografia líquida com a capacidade de análise da espectrometria de massa. Enquanto a coluna separa no tempo a maior parte dos compostos de uma mistura, o MS ioniza as moléculas desses compostos e separa-os de acordo com a razão  $m/z$ . Adicionalmente, um sistema LC-MS/MS é capaz de fragmentar o ião precursor com um determinado padrão de fragmentação e separar os iões produtos resultantes para identificação e quantificação.

### **3.7.1. Espectrometria de Massa**

Como já foi referido anteriormente um espectrómetro de massa é dividido em 3 partes fundamentais, que podem variar de equipamento para equipamento. Nesta tecnologia utilizou-se como fonte de iões o mecanismo de ionização por *electrospray* (ESI) e um analisador de massa do tipo triplo quadrupolo.

Em seguida vai fazer-se uma breve descrição da funcionalidade do espectrómetro de massa utilizado neste equipamento.

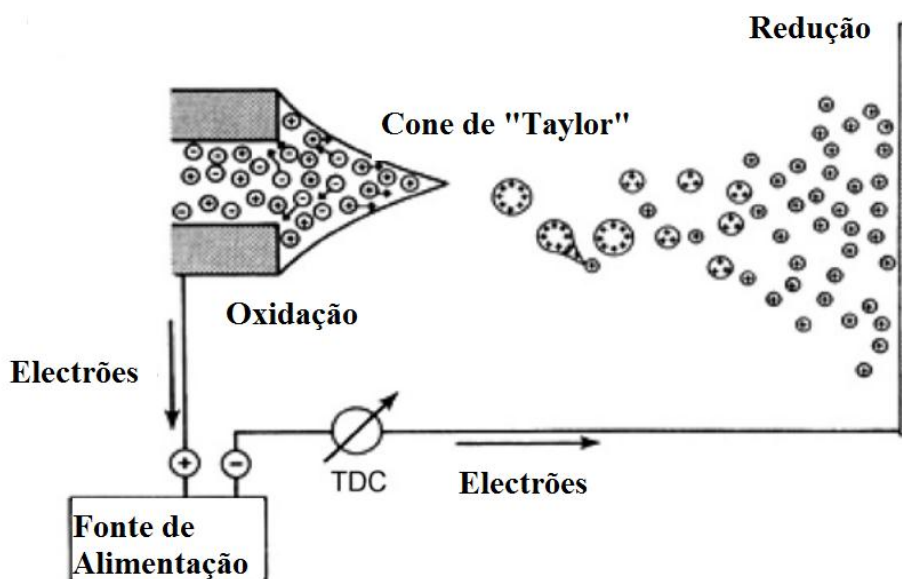
#### **3.7.1.1. Fonte de Ionização**

Neste tipo de ionização, o eluente proveniente da LC é introduzido num capilar metálico, ao qual é aplicado uma diferença de potencial elevada, levando à formação de um campo elétrico que originará a separação electroforética de cargas positivas e negativas na solução. Deste modo, a gota formada na ponta do capilar estará enriquecida por iões positivos ou negativos, dependendo do potencial aplicado. A evaporação do solvente, devido à ação do gás de nebulização, diminui o tamanho das gotas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas. A tensão superficial das gotas vai se tornar cada vez menor até que a gota seja rompida, fenómeno designado por “cone de Taylor”.



Após a libertação das gotas com elevada densidade de carga eletrolítica, forma-se um *spray*, que se desloca em direção ao contraelectrodo, onde vai ocorrer a dessolvatação. A evaporação do solvente é favorecida pelo auxílio de um gás de dessolvatação e pela energia térmica (76).

Na figura 16, está representado um esquema do processo de ionização por *electrospray*.



**Figura 16-** Esquema do processo de ionização por *electrospray* (adaptado de(77)).

A partir deste ponto existem dois mecanismos diferentes para a formação de iões na fase gasosa.

Segundo o modelo de carga residual, proposto por Dole em 1968, as gotas continuam a sofrer a evaporação num processo contínuo até que tenha ocorrido a total dessolvatação das moléculas, levando à formação de um ião isolado (78).

O outro modelo proposto por Thomson e Iribarne denominado modelo da evaporação do ião considera que com a evaporação, as gotas de solvente atingem um determinado raio em que a densidade elétrica na sua superfície é grande o suficiente para expulsar os analitos para fora das gotas. Neste modelo, não ocorre a rutura da gota, havendo, no entanto, desadsorção dos iões para a fase gasosa (79, 80).

Durante a ionização por *electrospray* podem-se formar três tipos de iões: iões moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas e aductos. A dimensão com que

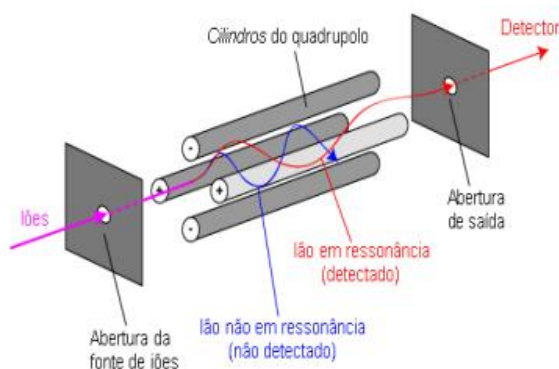
cada um destes íons é formado pode ser explicada em termos do balanço entre três processos distintos que ocorrem no interior do capilar: reações redox (oxidação/redução), que produzem íons moleculares; reações ácido/base (protonação/desprotonação) que leva à formação de moléculas protonadas ou desprotonadas; e, coordenação com cátions (geralmente metais alcalinos), ou aniões (principalmente cloretos), que leva à formação de aductos (80, 81).

A ionização dos HAAs ocorre através de reações ácido/base (protonação/desprotonação) devido às funções ácidas apresentadas pelos compostos em estudo. Neste tipo de reação os HAAs são mais facilmente desprotonados, ionizando no modo negativo a um pH ácido.

### 3.7.1.2. Analisador de Massa

Como já foi referido anteriormente existem vários analisadores de massa. Um dos analisadores mais comuns em LC-MS é o quadrupolo. Este tipo de analisador usa a estabilidade da trajetória em campos elétricos oscilantes, gerado por quatro barras metálicas (elétrodos), para separar os íons de acordo com a sua razão  $m/z$ .

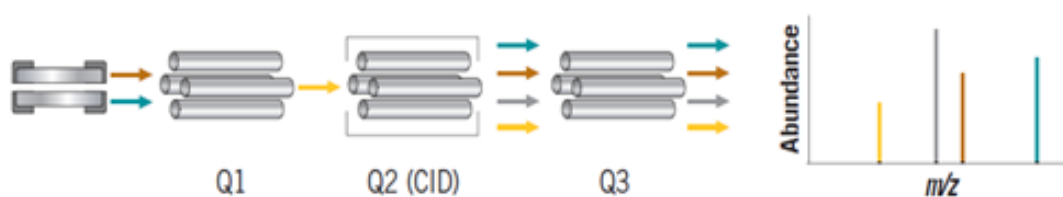
O campo elétrico é gerado nos quatro elétrodos paralelos, como podemos observar pela figura 18, pela aplicação de potenciais de corrente contínua fixa e voltagens de radiofrequência (RF) que vão alternando. Isto provoca, de modo alternado uma estabilização ou desestabilização da trajetória dos íons formados, pelo que se pode afirmar que o quadrupolo funciona como um filtro de íons. A voltagem de radiofrequência vai variando de forma a deixar passar íons de diferentes razões  $m/z$  para o detetor, de forma a construir um espectro de massa (70, 82).



**Figura 17** – Esquema de funcionamento de um quadrupolo (adaptado de(83)).

O equipamento utilizado neste trabalho apresenta um sistema do tipo triplo quadrupolo (MS/MS), ou seja, a junção de três quadrupolos em série. Esta técnica instrumental é também designada por espectrometria de massa *tandem*. A espectrometria de massa *tandem*, é qualquer método envolvendo pelo menos duas etapas de análise de massas, em conjunto com um processo de fragmentação ou de uma reação química que causa uma alteração na massa de um ião (70).

Este analisador de massa funciona do seguinte modo: no primeiro quadrupolo (Q1) ocorre a seleção de um ião precursor. O segundo quadrupolo (Q2) é uma célula de colisão, onde é introduzido um gás inerte de colisão (geralmente, Ar, He ou N<sub>2</sub>) a uma certa pressão que irá provocar colisões com o ião precursor que entra no quadrupolo. Este ião sofrerá uma fragmentação, processo denominado dissociação induzida por colisão, dando origem a diversos fragmentos denominados de iões produto. No terceiro quadrupolo (Q3) os iões produtos gerados na célula de colisão são separados por variação da voltagem de radiofrequência, tal como sucede no primeiro quadrupolo, seguindo depois para o detetor de massas. O triplo quadrupolo funciona normalmente em modo *Product ion scan* ou em modo MRM (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*) (70, 82). Na figura 19, encontra-se apresenta uma imagem que representa o modo de funcionamento de um triplo quadrupolo no modo RMR.



**Figura 18** – Esquema de um triplo quadrupolo, espectrometria de massa *tandem* (adaptado de (82)).

O modo de operação *Product ion scan* permite a seleção de um ião precursor com uma dada razão  $m/z$  e a análise de todos os iões produtos resultantes da colisão desse ião com um gás. Neste modo de operação, o primeiro quadrupolo está a operar

em modo SIM (do inglês, *Selected Ion Monitoring*), e o terceiro quadrupolo em modo *full scan*. Com este modo de operação é possível determinar os iões produtos resultantes da fragmentação do ião precursor.

Na análise de HAAs na água de consumo é importante trabalhar com o máximo de seletividade e sensibilidade possíveis, pelo que o modo de operação a utilizar para validação do método analítico e posterior análise em rotina foi o modo MRM. Neste modo de operação, os dois quadupolos trabalham no modo SIM selecionando e focando iões de razão  $m/z$  específicas. Este modo de operação permite a focagem nos iões precursores e produto por maiores períodos de tempo, conseguindo-se desta forma um aumento na sensibilidade e seletividade.

Neste sentido, é necessária a escolha de pelo menos duas transições ião precursor-ião produto (MRM1 e MRM2), uma utilizada para quantificação e a segunda para confirmação qualitativa do composto (84, 85).

### 3.8. Efeito da Matriz

Apesar da elevada seletividade da análise por LC-MS/MS, não é possível garantir a efetiva eliminação de interferentes endógenos. A análise quantitativa com ionização por *electrospray* poderá ser substancialmente prejudicada pela ocorrência de supressão ou reforço iónico causado pela presença de interferentes da amostra. Este fenómeno é definido como efeito da matriz, levando a resultados pouco confiáveis em análises quantitativas. Neste sentido, este parâmetro deve ser avaliado para a validação de um método utilizando LC-MS ou LC-MS/MS de forma a garantir que a precisão, seletividade e sensibilidade não são afetadas pela matriz (86, 87).

Os processos que levam ao fenómeno de efeito de matriz não são totalmente entendidos, mas são provavelmente devido a compostos presentes na matriz e que coeluem com os compostos alvo podendo influenciar a intensidade do sinal devido à sua participação no processo de ionização.

O fenómeno de supressão iónica pode ser dividido em 2 grupos: supressão iónica que ocorre na fase líquida ou na fase gasosa. Os compostos que coeluem podem interferir com o sinal do analito na fase líquida por mecanismos diferentes (80, 87):

— O primeiro mecanismo é baseado na competição pelas cargas disponíveis e pelo acesso à superfície da carga entre o analito e os componentes da matriz. A tensão superficial e a polaridade são propriedades essenciais para se verificar se um composto interferente irá competir ou não pela carga ou espaço limitados na superfície da gota. Em matrizes biológicas, onde estão presentes grandes quantidades de compostos endógenos com elevada basicidade e tensão superficial, a concentração limite de  $10^{-5}\text{M}$  é facilmente atingida, ocorrendo a supressão iônica.

— A presença de interferentes em elevadas concentrações pode aumentar a viscosidade e a tensão superficial das gotas, alterando a eficiência da sua formação e evaporação, alterando assim, a quantidade de iões do analito, em fase gasosa que chegam ao analisador.

— Os aditivos não-voláteis, como o sulfato de amônio, podem ser responsáveis pela supressão iônica através da formação de partículas sólidas que incluem o analito.

— Os componentes da matriz ou os aditivos da fase móvel podem atuar como reagentes de formação de par iônico com os iões de analito pré-formados.

Por outro lado os mecanismos de supressão iônica que ocorrem na fase gasosa também são vários: nomeadamente o analito pode ser transferido para a fase gasosa como um ião ou como parte de um agregado carregado de moléculas o solvente; na fase gasosa pode também ocorrer a perda de carga do ião do analito, resultante de reações de neutralização ou de transferência de carga, devido à presença de interferentes ou de um solvente com elevada basicidade.

No processo inverso, pode também ocorrer o fenómeno de enriquecimento iônico, e por isso deve-se ter atenção aos iões escolhidos no modo MRM. Dependendo dos iões fragmentados a um determinado valor de  $m/z$  poderá ocorrer sobreposição com interferentes da matriz levando a um aumento do sinal (87).



## **Capítulo 4- Validação do Método Analítico**

### **4.1. Nota Introdutória**

Um dos principais requisitos em qualquer processo que envolva análises químicas é a obtenção de dados de qualidade que atinjam a finalidade proposta. Nesse sentido, a validação de métodos analíticos tem como objetivo demonstrar, através de estudos laboratoriais, que o método é adequado aos requisitos exigidos pela aplicação analítica pretendida, isto é, o processo de validação pretende demonstrar que o método é adequado para a quantificação do analito numa determinada matriz, a um certo nível de concentração, com exatidão e precisão satisfatórias.

A validação de um método analítico confere uma garantia de qualidade operacional e de desempenho analítico. Através deste processo procura-se demonstrar que o método analítico em causa é adequado para a análise da amostra. Este processo é moroso mas vital para dar credibilidade ao método analítico desenvolvido/aplicado.

Quando se pretende implementar um método de análise é necessário realizar alguns estudos de validação antes de o colocar em rotina, para que este origine resultados fiáveis e interpretáveis.

Os parâmetros analíticos normalmente estudados para a validação de métodos analíticos são: sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão, gama de trabalho e linearidade e limiares analíticos.

### **4.2. Sensibilidade**

A sensibilidade traduz a capacidade, de um método ou equipamento, de distinguir pequenas diferenças de concentrações do analito ou de determinar pequenas concentrações do analito na amostra.

Este parâmetro pode ser definido pelo quociente entre o acréscimo do valor lido e a variação da concentração correspondente a esse acréscimo. É normalmente, expressa através do declive de uma reta de calibração (polinómio de grau 1) (88-90).

### 4.3. Seletividade

O termo seletividade de um método analítico refere-se à capacidade para quantificar um analito numa mistura complexa, sem que haja a interferência de outros componentes presentes na matriz da amostra.

Um método diz-se ainda específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação, devendo ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (90).

### 4.4. Precisão

A precisão de um método analítico define o grau de concordância entre os resultados de medidas independentes, quando o processo é aplicado uma série de vezes numa amostra sob as mesmas condições analíticas. A precisão de um procedimento analítico é geralmente expressa através do desvio padrão absoluto ( $s$ ) ou pelo coeficiente de variação ( $CV$ ) de uma série de medições.

O desvio padrão absoluto é dado pela expressão:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Equação 25})$$

onde  $\bar{x}$  é a média aritmética de um numero  $n$  de medições,  $x_i$  é o valor individual de uma medida e  $n$  corresponde ao número total de medições feitas na mesma amostra.



Se a precisão for expressa através do coeficiente de variação (*CV*), este é dado por:

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 26})$$

A precisão de um método analítico é avaliada através de ensaios de repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

Existem vários fatores que podem influenciar a precisão de um método analítico, nomeadamente o operador, o equipamento, a calibração do equipamento, ambiente e tempo entre medições (88, 90).

#### **4.4.1. Repetibilidade**

A repetibilidade representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um método analítico, efetuadas sob as mesmas condições de medição, designadas condições de repetibilidade: o mesmo operador, mesmo dia de análise e mesmo equipamento.

A repetibilidade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e pode ser expressa através do coeficiente de variação (89, 90).

#### **4.4.2. Precisão Intermédia**

A precisão intermédia indica o efeito de variações dentro do laboratório devido a fatores como diferentes dias de análise, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A precisão intermédia é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados. O objetivo da precisão intermédia é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados em condições diferentes. A precisão intermédia pode ser expressa através do coeficiente de variação (89, 90).

#### **4.4.3. Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade refere-se à precisão obtida fazendo variar as condições de medição (diferentes laboratórios, operadores, equipamentos e condições de análise) sobre a mesma amostra. A reprodutibilidade é obtida através de ensaios interlaboratoriais (90).

#### **4.5. Exatidão**

A exatidão de um método analítico é definida através da concordância dos resultados obtidos por um método quando comparado com o valor estabelecido convencionalmente como verdadeiro para um determinado composto. A exatidão deve ser estudada, quando possível, ao longo da gama de trabalho.

A exatidão pode ser avaliada através de ensaios de recuperação e ensaios interlaboratoriais.

A exatidão de um método pode variar em toda a gama de trabalho, pelo que deve ser determinada em diferentes níveis de fortificação (88, 90).

#### **4.6. Quantificação**

De formar, a interpretar as informações obtidas pelos estudos realizados é necessário proceder à determinação de vários parâmetros, tais como (88-90):

- Curvas de calibração
- Limiares analíticos do método de ensaio

##### **4.6.1. Curvas de Calibração**

A calibração é um processo pelo qual se relaciona a resposta de um sistema de medida com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Este processo envolve a preparação de padrões de concentração conhecida do analito a

quantificar de forma a abranger a gama total das concentrações das amostras a analisar. De seguida, procede-se à construção da curva de calibração, sinal vs concentração do analito, a partir da qual é possível a determinação, por interpolação, da concentração do analito na amostra.

A calibração analítica deve ser feita de acordo com a norma ISO 8466-1 (91), de forma a obterem-se regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados (descrito no anexo 1). Este método define que no eixo das ordenadas se representa a resposta instrumental do equipamento e que o valor da concentração das soluções padrão se encontra expresso no eixo das abcissas.

No processo de calibração, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é um parâmetro com importância para a aceitação da curva de calibração. Em análise química, dependendo dos critérios internos de cada laboratório, as curvas de calibração devem ter valores de coeficientes de determinação de valor igual ou superior a 0,990.

### **Gama de Trabalho**

A gama de trabalho de um método analítico corresponde ao intervalo compreendido entre a concentração mais alta e mais baixa do analito, para o qual foi demonstrado que o procedimento analítico possui precisão, exatidão e linearidade.

### **Linearidade**

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade de fornecer resultados de ensaios que são diretamente proporcionais à concentração de analitos nas amostras dentro de uma determinada gama de trabalho. A linearidade pode ser avaliada através de modelos estatísticos, como o teste de Mandel, análise de resíduos ou o teste de Rikilt.

#### 4.6.2. Limiares Analíticos do Método de Ensaio

Quando são realizadas análises em amostras com baixos teores de analito, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detetado e quantificado pelo método.

Os limites inferiores da curva de calibração são concentrações que indicam a capacidade de deteção e quantificação do método analítico a esse nível de concentração.

##### Limite de deteção - LoD

O limite de deteção (LoD, *Limit of Detection*) de um método analítico é definido pelo valor de concentração mais baixo, a partir do qual um analito numa amostra pode ser detetado de forma segura, mas não necessariamente quantificado como um valor exato.

O limite de deteção pode ser calculado através da equação 27:

$$LoD = 3 \times s_{xo} \quad (\text{Equação 27})$$

onde,  $s_{xo}$  é a estimativa do desvio padrão de várias leituras do branco ou da solução com a concentração mais baixa do intervalo de linearidade.

Se o método analítico envolver a utilização de uma curva de calibração, o limite de deteção pode ser calculado através do desvio padrão residual da reta de calibração, que é definido pela equação:

$$LoD = \frac{|3 \times s_{y/x}|}{b} \quad (\text{Equação 28})$$

onde,  $s_{y/x}$  é o desvio padrão residual da reta de calibração e  $b$  o seu declive (89, 90).

### **Limite de quantificação – LoQ**

O limite de quantificação (LoQ, *Limit of Quantification*) corresponde ao menor valor de concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, utilizando um determinado procedimento experimental.

O limite de quantificação pode ser calculado a partir da equação:

$$LoQ = 10 \times S_{xo} \quad (\text{Equação 29})$$

onde  $S_{xo}$  é o desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade.

Como foi apresentado para o limite de deteção, se o método analítico envolver a utilização de uma calibração linear, o limite de quantificação poderá ser calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, a partir da expressão 30:

$$LoQ = \frac{|10 \times s_{y/x}|}{b} \quad (\text{Equação 30})$$

onde,  $s_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração e  $b$  o declive da mesma curva (89, 90).



## Capítulo 5 - Parte Experimental

### 5.1. Procedimento Experimental Utilizando o Método SPME-GC/ITMS

#### 5.1.1. Equipamento e Material

##### 5.1.1.1. Equipamento

- Cromatógrafo gasoso, modelo 450-GC, Varian, equipado com:
  - PAL autosampler, Varian
  - Software Varian MS workstation 6.9.2
  - Coluna cromatográfica, Fator 4 capillary column VF-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), Varian
- Espectrómetro de massa (*Ion trap*), modelo 240 MS, Varian
- Balança analítica, modelo AE240, Mettler
- Sistema de obtenção de água ultra pura, modelo Milli-Q® Advantage A - 10®, Millipore
- Vortex, modelo Genie 2, Scientific Industries

##### 5.1.1.2. Material

Nesta secção descreve-se o material específico utilizado na aplicação desta metodologia, e não são referidos materiais de uso corrente de laboratório.

- Fibras para microextração em fase sólida, Supelco:
  - Carboxeno/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), 75 µm
  - Polidimetilsiloxano (PDMS), 100 µm

- Poliacrilato (PA), 85  $\mu\text{m}$
- Carbowax/divinilbenzeno (PDMS/DVB), 65  $\mu\text{m}$
- Divinilbenzeno-Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB-CAR/PDMS), 50  $\mu\text{m}$
- Frascos de SPME de 20 mL, Varian
- Vials de 1,5 mL, VWR International
- Seringas de 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  e 250  $\mu\text{L}$ , Agilent Technologie

### 5.1.2. Reagentes

#### 5.1.2.1 Reagentes Gerais

- Água ultra pura (Millipore)
- Acetona,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , Merck, pureza  $\geq 99,8\%$ , Merck
- Éter metil terc-butílico,  $(\text{CH}_3)_3\text{COCH}_3$ , Merck, pureza  $\geq 99,5\%$
- Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , Merck, pureza  $\geq 99,8\%$
- Sulfato de sódio anidro,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Merck, pureza  $\geq 99,5\%$

#### 5.1.2.2. Padrões primários

Todos os padrões analíticos utilizados neste trabalho apresentam um grau de pureza  $\geq 99\%$ .

- Cloroacetato de metilo,  $(\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}_2)$ , Chem Service
- Bromoacetato de metilo,  $(\text{C}_3\text{H}_5\text{BrO}_2)$ , Chem Service
- Dicloroacetato de metilo,  $(\text{C}_3\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}_2)$ , Chem Service
- Dibromoacetato de metilo,  $(\text{C}_3\text{H}_4\text{Br}_2\text{O}_2)$ , Chem Service
- Bromocloroacetato de metilo,  $(\text{C}_3\text{H}_4\text{BrClO}_2)$  Chem Service



- Tricloroacetato de metilo, ( $C_3H_3Cl_3O_2$ ), Chem Service
- Tribromoacetato de metilo, ( $C_3H_3Br_3O_2$ ), Chem Service
- Bromodicloroacetato de metilo, ( $C_3H_3BrCl_2O_2$ ), Chem Service
- Clorodibromoacetato de metilo, ( $C_3H_3ClBr_2O_2$ ) Chem Service

Nota: Nas descrições apresentadas no texto mantiveram-se as siglas HAAs, apesar de se estar a trabalhar com os respetivos ésteres metílicos.

### **5.1.3. Preparação de Soluções**

#### **5.1.3.1 Soluções Padrão Primárias (SPP)**

Os padrões comerciais individuais de cada HAAs são comercializados em ampolas de vidro de 1 mL. Antes do seu uso, o volume existente nessas ampolas tem de ser transferido para um vial e guardado no frigorífico a uma temperatura entre 2 a 8 °C. Os padrões comerciais apresentam uma concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **5.1.3.2. Soluções para Otimização das Condições Cromatográficas e do Espectrómetro de Massa**

##### **5.1.3.2.1. Soluções Padrão Individuais**

As otimizações das condições do GC-ITMS foi efetuada por injeção líquida. Desta forma, preparou-se uma solução em que foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  da solução padrão primária (SPP), a um balão volumétrico de 5 mL e acertou-se o volume com MTBE. Esta solução padrão individual tem uma concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

##### **5.1.3.2.2. Solução Padrão Conjunta**

A solução padrão conjunta foi feita da mesma forma que as soluções padrão individuais, tendo sido retirado 250  $\mu\text{L}$  do respetivo solução padrão primária (SPP), e acertou-se o volume com MTBE. A concentração de cada HAA nesta solução padrão conjunta é de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 5.1.3.3. Soluções para Otimização das Condições da SPME

#### 5.1.3.3.1. Solução Padrão Conjunta

Esta solução padrão conjunta foi preparada segundo o seguinte procedimento: retirou-se o volume de 50 µl das soluções padrão primárias de cada HAA para um balão volumétrico de 5 mL e acertou-se o volume com metanol. A concentração de cada HAA nesta solução padrão conjunta é de 1 µg mL<sup>-1</sup>.

### 5.1.4. Método Analítico SPME-GC/ITMS

#### 5.1.4.1. Otimização das Condições Cromatográficas

Iniciou-se o trabalho em modo *full scan* para verificar os tempos de retenção e a resolução cromatográfica de cada composto por injeção das soluções padrão individual de cada HAA, descritas em 5.1.3.2.1.

As condições previamente definidas para o GC-MS encontram-se descritas nas tabelas 6, 7 e 8. O modo de ionização utilizado foi a electroionização.

**Tabela 6-** Condições cromatográficas.

Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Gás de arraste	Hélio
Razão de fluxo	1 mL/min
Temperatura do injetor	270 °C
Volume de injeção	1 mL
Tipo de coluna	VF-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm)

**Tabela 7** - Programa de temperatura do forno do sistema cromatográfico.

Temperatura (°C)	Gradiente (°C/min)	Tempo de aquecimento (min)	Tempo da corrida (min)
40	0	0	0
50	2	4	9
70	10	1	12
150	20	0	16
250	40	2	20,5

**Tabela 8-** Condições do Espectrómetro de Massa.

Condições do detetor em <i>full scan</i>	
Temperatura da <i>Trap</i>	170 °C
Tipo de analisador	MS- <i>Ion trap</i>
Intervalo de Massas	50 - 450 <i>m/z</i>

Depois de determinados os tempos de retenção de cada composto, procedeu-se à injeção da solução padrão conjunta, descrita em 5.1.3.2.2., por forma a analisar o perfil cromatográfico da mistura, utilizando as mesmas condições referidas anteriormente.

#### 5.1.4.2. Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa

Com as condições cromatográficas definidas foram testados dois modos de ionização, electroionização e ionização química, com o objetivo de determinar o ião precursor de cada HAA. Neste sentido, procedeu-se à injeção da solução padrão conjunta (secção 5.1.3.2.2.), em modo *full scan* nas condições referidas nas tabelas 6, 7 e 8. No modo de ionização química utilizou-se como gás reagente o metanol.

Após a escolha dos iões precursores procedeu-se ao desenvolvimento do método AMD (*Automated Method Development*). A utilização deste método tem como princípio determinar as condições de dissociação prévias que permitem

desenvolver o método MS/MS, por forma a determinar o nível de excitação para armazenamento e a energia de dissociação induzida por colisão (CID), adequados a cada HAA. Para cada composto alvo, injetou-se a solução padrão individual, descrita em 5.1.3.2.1., tendo-se variado a energia de excitação entre 0 e 120V utilizando um tipo de onda não-ressonante. No método AMD, o nível de excitação para armazenamento é normalmente determinado a partir de funções apresentadas no *software*.

Depois de serem realizados vários testes no âmbito do desenvolvimento do método AMD, utilizando a electroionização e a ionização química, optou-se por utilizar o modo de ionização química na aquisição de dados no modo MS/MS.

A definição das condições cromatográficas e do espectrómetro de massa permitiu a criação do programa de aquisição de dados no modo MS/MS encontram-se referidas na tabela 9.

**Tabela 9** - Programa de aquisição dos dados no modo MS/MS, em ionização química

Ácidos Haloacéticos *	Janelas do programa (min)	Ião precursor (m/z)	Nível de excitação para armazenamento (m/z)	CID (V)
MCAA	5,00-7,00	109	48	36
MBAA	7,00-12,00	153	67,4	49
DCAA		143	63	44
TCAA	12,30-13,50	177	78	42
BCAA		187	82,4	62
DBAA	12,30-13,50	233	102,6	78
BDCAA		223	98,2	53
CDBAA	14,20-15,00	267	117,6	70
TBAA	15,30-16,30	311	137	85

\* Mantiveram-se as siglas dos HAAs, apesar de se estar a analisar os respetivos ésteres metílicos.

#### 5.1.5. Otimização das Condições de SPME

Com o objetivo de otimizar as condições de preparação da amostra, mediu-se 10 mL de água ultra pura para os frascos de SPME tendo-se fortificado com 200 µL

da solução padrão conjunta descrita em 5.1.3.3.1. A solução fortificada apresenta uma concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  para cada um dos compostos.

A otimização do método de SPME, iniciou-se com uma fibra do tipo CAR-PDMS, utilizando o modo de extração por *headspace* (HS), nas condições de extração apresentadas na tabela 10.

**Tabela 10** – Condições de extração por HS-SPME.

Temperatura de extração/derivatização	55 °C
Velocidade de agitação	200 rpm
Temperatura de desadsorção	280 °C
Tempo de desadsorção	1 min
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5g
Volume de amostra	10 mL
Modo de injeção	<i>splitless</i>

Foram testados vários parâmetros com o objetivo de otimizar o processo de extração por SPME:

- Tipo de fibra
- Tempo de extração
- Temperatura de extração
- Velocidade de agitação
- Tempo de dessorção
- Temperatura de dessorção
- Efeito salino

Durante o processo de otimização das condições de extração utilizaram-se as condições referentes ao MS, apresentadas na tabela 9.

## 5.2. Procedimento Experimental Utilizando o Método UPLC- ESI-MS/MS

### 5.2.1. Equipamento e Material

#### 5.2.1.1. Equipamento

- Cromatógrafo líquido de ultra resolução UPLC, modelo Acquity System, Waters, constituído por:
  - Software Masslynx versão 4.1 SCN714, Micromass Ltd
  - Coluna cromatográfica, ACQUITY UPLM™ BEH C8
  - Desgaseificador
  - Bomba quaternária
  - Injetor automático
  - Compartimento termostatzado para a coluna
- Espectrómetro de massa (MS/MS), modelo Quattro micro API triple quadrupole and Acquity TDQ da Waters, constituído por:
  - Sonda de ionização por *electrospray*
  - Analisador de triplo quadrupolo
  - Multiplicador de eletrões
- Balança analítica, modelo AE240, Mettler
- Vortex, modelo Genie 2, Scientific Industries
- Sistema de obtenção de água ultra pura, modelo Milli-Q® Advantage A-10®, Millipore
- Sistema de evaporação sob fluxo de azoto, modelo *Turbo Vap II*, Zymark

#### 5.2.1.2. Material

O material descrito neste tópico é referente ao material específico utilizado durante o desenvolvimento desta metodologia analítica. Não se apresenta material de uso corrente de laboratório.

- Vials de vidro borosilicato, âmbar, 19x32 mm, com roscas de polipropileno e septos de silicone, Preslit, Waters
- Membrana filtrante de celulose, 2 µm, Millipore
- Seringas de 10 µL, 50 µL, 100 µL e 250 µL, Agilent Technologie

#### 5.2.2. Reagentes

##### 5.2.2.1. Reagentes Gerais

- Água ultra pura (Millipore)
- Acetona,  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , Merck, pureza  $\geq 99,8\%$
- Éter metil terc-butilico,  $(\text{CH}_3)_3\text{COCH}_3$ , Merck, pureza  $\geq 99,5\%$
- Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , Merck, pureza  $\geq 99,8\%$
- Acetonitrilo,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , Merck, pureza  $\geq 99,9\%$
- Ácido acético,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Merck, pureza 100%

##### 5.2.2.2. Padrões Primários

Todos os padrões analíticos utilizados neste trabalho apresentam um grau de pureza superior a 98%.

- Ácido monocloraacético, MCAA,  $(\text{C}_2\text{H}_3\text{ClO}_2)$ , Chem Service
- Ácido monobromoacético, MBAA,  $(\text{C}_2\text{H}_3\text{BrO}_2)$ , Chem Service

- Ácido dicloroacético, DCAA, ( $C_2H_2Cl_2O_2$ ), Chem Service
- Ácido dibromoacético, DBAA, ( $C_2H_2Br_2O_2$ ), Chem Service
- Ácido bromocloroacético, BCAA, ( $C_2H_2BrClO_2$ ), Chem Service
- Ácido tricloroacético, TCAA, ( $C_2HCl_3O_2$ ), Chem Service
- Ácido tribromoacético, TBAA, ( $C_2HBr_3O_2$ ), Chem Service
- Ácido bromodicloroacético, BDCAA, ( $C_2HBrCl_2O_2$ ), Chem Service
- Ácido clorodibromoacético, CDBAA, ( $C_2HClBr_2O_2$ ), Chem Service

### 5.2.2.3. Amostras

Neste trabalho, foram analisadas amostras de água para consumo captadas em diferentes zonas do sistema de abastecimento da EPAL.

## 5.2.3. Preparação de Soluções

### 5.2.3.1. Fase Móvel

Na otimização das condições cromatográficas foi usada uma fase móvel composta por dois solventes, como se pode observar na tabela 11.

**Tabela 11-** Fase móvel utilizada nas condições cromatográficas.

Solvente A	Solvente B
Água + 0,2% ácido acético (v/v)	Acetonitrilo

Os solventes (A e B) foram preparados da seguinte forma:

Para se proceder à preparação do solvente A, adicionou-se 2 mL de ácido acético a um balão volumétrico de 1000 mL contendo água ultra pura. O volume do balão foi aferido com água ultra pura, ficando a solução com um pH final de 3. Posteriormente, o solvente A foi filtrado num sistema de vácuo recorrendo a uma membrana filtrante de celulose com 2 µm de porosidade.



O solvente B é constituído apenas por acetonitrilo. Antes do seu uso filtrou-se 500 mL do solvente B num sistema de vácuo, sendo o mesmo transferido depois para um balão volumétrico de 500 mL.

### **5.2.3.2. Soluções Padrão**

#### **5.2.3.2.1. Soluções Padrão Primárias (SPP)**

Os padrões comerciais individuais de cada HAA são comercializados em ampolas de vidro de 1 mL. Antes do seu uso, o volume existente nessas ampolas tem de ser transferido para um vial e guardado no frigorífico a uma temperatura entre 2 a 8 °C. Os padrões comerciais apresentam uma concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup>, exceto os padrões de BDCAA e o CDBAA que apresentam uma concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>.

### **5.2.3.3. Soluções para a Otimização das Condições de Operação do Espectrómetro de Massa**

#### **5.2.3.3.1. Soluções Padrão Individuais para Infusões (SPII)**

Para vials de 1 mL foi preparada uma solução padrão intermédia individual de cada HAA com uma concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup>, utilizando metanol como solvente de diluição. Pipetaram-se 100 µL das soluções padrão primárias (SPP), dos HAAs para um vial e acertou-se o volume de 1 mL com metanol. No caso do CDBAA e o BDCAA pipetaram-se apenas 10 µL. De cada solução padrão intermédia individual de HAA, retiraram-se 200 µL para um vial de 1 mL e diluiu-se com água ultra pura, ficando com 9 soluções. As soluções padrão individuais para infusões (SPII), têm uma concentração de 2 µg mL<sup>-1</sup>.

#### **5.2.3.4. Soluções para a Otimização das Condições Cromatográficas**

##### **5.2.3.4.1. Soluções Padrão Individuais para Injeção Cromatográfica (SPIIC)**

Para cada composto, pipetaram-se 50  $\mu\text{L}$  da solução padrão primárias (SPP), de cada HAA para um balão volumétrico de 5 mL e fez-se o volume com metanol. No caso do CDBAA e o BDCAA foi retirado um volume de 5  $\mu\text{L}$ . Esta solução possui uma concentração final de 1  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

Da solução anterior retiraram-se 500  $\mu\text{L}$  para um balão volumétrico de 5 mL e fez-se com água ultra pura. As soluções padrão individuais para injeção cromatográfica (SPIIC) têm uma concentração de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

##### **5.2.3.4.2. Solução Padrão Conjunta para Injeção Cromatográfica (SPCIC)**

Esta solução padrão conjunta foi preparada de acordo com o seguinte procedimento: retirou-se 50  $\mu\text{L}$  das soluções padrão primária (SPP), de cada HAA para um balão de 5 mL e fez-se o volume com metanol. No caso do CDBAA e o BDCAA foi retirado um volume de 5  $\mu\text{L}$ . A concentração de cada HAA nesta solução conjunta é de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Da solução preparada anteriormente retirou-se 500  $\mu\text{L}$  para um balão volumétrico de 5 mL contendo água ultra pura. Esta solução padrão conjunta para injeção cromatográfica (SPCIC), têm uma concentração de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### **5.2.3.5. Soluções para o Estudo da Linearidade**

##### **5.2.3.5.1. Solução Padrão Conjunta para o Estudo da Linearidade (SPCEL)**

A solução padrão conjunta dos HAAs, utilizada para realizar os estudos iniciais de linearidade, foi preparada de acordo com o seguinte procedimento: retiraram-se os volumes indicados na tabela 12, de cada solução padrão primária (SPP), para um balão volumétrico de 5 mL e acertou-se o volume deste balão com metanol.

**Tabela 12** – Volume adicionado de cada solução padrão primária e concentração dos HAAs na solução padrão conjunta.

Ácidos Haloacéticos	Volume da solução padrão primária (SPP) ( $\mu\text{L}$ )	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
MCAA	50	1
DCAA	50	1
BCAA	50	1
MBAA	50	1
DBAA	50	1
TCAA	50	1
BDCAA	5	1

#### 5.2.3.5.2. Soluções Padrão para o Estudo de Linearidade (SPEL)

Para o estudo inicial da linearidade, foram preparadas 14 soluções padrão conjunta a para o estudo de linearidade (SPEL), com concentrações compreendidas entre 5 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , partir da solução padrão conjunta para o estudo de linearidade (SPCRL).

#### 5.2.3.6. Soluções Padrão de Trabalho para Validação da Gama de Trabalho

##### 5.2.3.6.1. Solução Padrão Conjunta para Validação (SPCV)

A partir dos volumes de cada solução padrão primária (SPP), indicados na tabela 13 preparou-se uma nova solução usando um balão volumétrico de 5 mL e acertou-se o volume final com metanol.

**Tabela 13-** Volume adicionado de cada solução padrão primária e concentração de cada HAA na solução padrão conjunta para validação (SPCV).

Ácidos Haloacéticos	Volume solução padrão primária ( $\mu\text{L}$ )	Concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
MCAA	75	1,5
DCAA	50	1
BCAA	75	1,5
MBAA	50	1
DBAA	50	1
TCAA	150	3
BDCAA	25	5

#### 5.2.3.6.2. Soluções Padrão de Trabalho para Validação (SPTV)

As soluções padrão de trabalho dos HAAs usadas para a validação do método analítico foram preparadas por diluição da solução padrão conjunta (SPCV), com água ultra pura. Foram preparados 9 soluções padrão de trabalho para validação (SPTV), como se pode observar na tabela 14.

**Tabela 14** - Volume adicionado de cada solução padrão primária (SPP) e concentração de cada HAA nas soluções padrão de trabalho para validação (SPTV).

Soluções Padrão de Trabalho para Validação									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Volume dos balões (mL)									
	20	20	10	10	10	5	5	5	5
Volume adicionado da solução padrão primária (SPP) (µL)									
	100	150	100	150	200	150	200	250	300
Ácidos Haloacéticos	Concentração na solução padrão de trabalho (SPTV) (µg L <sup>-1</sup> )								
MCAA	7,5	11,25	15	22,5	30	45	60	75	
MBAA	5	7,5	10	15	20	30	40	50	
DCAA	5	7,5	10	15	20	30	40	50	60
BCAA	7,5	11,25	15	22,5	30	45	60	75	
DBAA	5	7,5	10	15	20	30	40	50	60
TCAA	15	22,5	30	45	60	90	120	150	
BDCAA	25	37,5	50	75	100	150	200	250	300

#### 5.2.3.7. Soluções Padrão para o Estudo da Precisão (SPEP)

A partir da solução padrão conjunta para validação (SPCV), prepararam-se várias soluções com concentrações correspondentes aos limites inferiores (P1) e superiores (P8 ou P9) da gama de trabalho para cada um dos HAAs em estudo.

#### 5.2.3.8. Soluções Padrão da Etapa de Concentração da Amostra (SPECA)

Estas soluções foram preparadas de modo a estudar a possibilidade de baixar o limite de quantificação do método, usando um passo de concentração prévia da amostra, por evaporação das soluções em corrente de azoto no *Turbo Vap*.

Estas soluções foram preparadas a partir de dois níveis de fortificação diferentes (tabela 15), em balões volumétricos de 10 mL com água ultra pura. Deste

modo, foram preparadas soluções a partir da solução padrão conjunta de validação (SPCV).

**Tabela 15** - Níveis de fortificação usado para o estudo das recuperações na etapa de concentração da amostra.

Ácidos Haloacéticos	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	Nível de Fortificação 1	Nível de Fortificação 2
MCAA	1,5	7,5
DCAA	1	5
BCAA	1,5	7,5
MBAA	1	5
DBAA	1	5
TCAA	3	15
BDCAA	5	25

#### 5.2.3.9. Soluções Padrão para Estudo do Efeito da Matriz (SPEM)

Utilizando a solução padrão conjunta para validação (SPCV), foram preparadas 6 soluções em cada nível de fortificação usando como matriz a água da torneira e a água ultra pura, como se pode observar na tabela 16.

**Tabela 16-** Níveis de fortificação para o estudo do efeito da matriz.

Ácidos Haloacéticos	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	Nível de Fortificação 1	Nível de Fortificação 2	Nível de Fortificação 3
MCAA	7,5	15	75
DCAA	5	10	50
MBAA	5	10	50
BCAA	7,5	15	75
DBAA	5	10	50
TCAA	15	30	150
BDCAA	25	50	250

O nível de fortificação 1 corresponde à concentração do primeiro padrão da gama de trabalho, o segundo nível corresponde a uma concentração intermédia e o terceiro nível corresponde ao último padrão da gama de trabalho.

#### 5.2.4. Método Analítico UPLC-ESI-MS/MS

##### 5.2.4.1. Otimização do Método Analítico

O desenvolvimento de um método de LC-MS envolve várias etapas de otimização, nomeadamente as condições do espectrómetro de massa, cromatográficas e, sempre que necessário, os parâmetros relacionados com a preparação da amostra.

Numa primeira fase tem-se como objetivo a otimização das condições de trabalho do espectrómetro de massa, nomeadamente a obtenção do ião precursor de cada HAA, resultante da ionização do analito, e de seguida a obtenção dos iões produto resultantes da fragmentação do ião precursor.

Na tabela 17, estão apresentados os parâmetros definidos durante o processo de otimização do espectrómetro de massa.

**Tabela 17** - Condições previamente definidas para o espectrómetro de massa.

Gás de nebulização, dessolvatação e de cone	Azoto
Gás de colisão	Árgon
Ionização	<i>Electrospray negativo (ESI-)</i>
Extrator (V)	2
Radio-frequência	0,1
Temperatura da fonte (°C)	150
Temperatura de dessolvatação (°C)	450
Fluxo do gás de dessolvatação (L/h)	900
Fluxo do gás de cone (L/h)	50

#### 5.2.4.1.1. Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa

A otimização das condições de formação do ião precursor de cada HAA, obtido através da ionização dos compostos por *electrospray* em modo negativo, foram realizadas através da infusão de cada solução padrão individual para infusão (SPII), descrita em 5.2.3.3.1., por meio de uma seringa externa de fluxo contínuo (10  $\mu\text{L min}^{-1}$ ).

Nesta fase de otimização apenas se, utilizou o azoto como gás de dessolvatação, mantendo-se desligado o gás de colisão (árgon).

A solução é injetada em modo de aquisição *full scan* para o primeiro quadrupolo, de forma a verificar todos os iões precursores possíveis para cada composto. Neste estudo fez-se variar a voltagem de cone para cada um dos compostos, em modo de ionização negativo, entre 5 e 35 V. Este ensaio permitiu a determinação da voltagem de cone ótima para a formação do ião precursor de cada composto com maior intensidade de sinal.



A fase seguinte da otimização do espectrómetro de massa consiste na escolha dos iões produto a partir do ião precursor escolhido para cada analito (modo de aquisição *product ion scan*).

Assim, uma vez definida a voltagem do cone ótima para a formação de cada ião precursor dos analitos, faz-se a programação do primeiro quadrupolo que opera em modo SIM e permite apenas a passagem do ião precursor escolhido, enquanto que o terceiro quadrupolo opera em modo *full scan*.

Nesta fase de otimização é avaliado o efeito da energia de colisão, de forma a verificar os fragmentos resultantes da fragmentação do ião precursor. Neste passo fez-se variar a energia de colisão entre 5 e 20 eV, na célula de colisão (segundo quadrupolo), do espectrómetro de massa.

A solução utilizada na otimização da energia de colisão foi a solução padrão individual para infusão (SPII), apresentada em 5.2.3.3.1.

A escolha da anergia de colisão deve obedecer a vários requisitos: nomeadamente, escolher os iões produto com maior intensidade de sinal que resultem da fragmentação do ião precursor; o ião precursor deve estar sempre presente quando os iões produtos são seleccionados; deve-se utilizar, sempre que possível, iões produto diferentes provenientes do mesmo ião precursor.

Depois de otimizados os parâmetros operacionais de obtenção do ião precursor e dos respetivos iões produto, estão reunidas as condições para definir as duas transições para cada analito em estudo. A primeira transição (MRM1) é utilizada na quantificação e a segunda (MRM2) é usada na qualificação de cada composto.

#### **5.2.4.1.2. Otimização da Voltagem do Capilar**

Para otimizar a voltagem do capilar, foi injetada a solução padrão conjunta para injeção cromatográfica (SPCIC), descrita em 5.2.3.4.2., no modo MRM. Neste modo de operação os dois quadrupolos estão focados nas massas seleccionadas do ião precursor e dos iões produto que foram anteriormente determinadas. Neste parâmetro de otimização foi estudada a relação entre a intensidade do sinal dos diferentes compostos alvo e a variação da voltagem do capilar entre 0,5 e 5 kV.

#### **5.2.4.2. Otimização das Condições Cromatográficas**

A otimização das condições cromatográficas permite otimizar a separação cromatográfica dos compostos em estudo, estabelecer a ordem de eluição dos compostos e verificar a existência de algum tipo de interferente que possa prejudicar a análise. Desta forma, procedeu-se à otimização de determinados parâmetros: temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e o volume de injeção.

Assim, foram feitos estudos com diferentes temperaturas da coluna a 30, 40 e 50 °C, e testados três fluxos de fase móvel 0,2, 0,3 e 0,4 mL min<sup>-1</sup>. Foram ainda estudados diferentes volumes de injeção entre 0,5 e 20 µL.

Nestes ensaios, utilizou-se a solução padrão conjunta para injeção cromatográfica (SPCIC), descrita em 5.2.3.4.2., os resultados foram avaliados quanto ao perfil de resposta cromatográfica (intensidade de sinal, em termos de área do pico, forma do pico, resolução dos picos e razão sinal/ruído).

O gradiente da fase móvel e a coluna cromatográfica utilizada na etapa de otimização das condições cromatográficas encontra-se apresentado na figura 20.

#### **5.2.5. Validação do Método Analítico UPLC-ESI-MS/MS**

Os estudos iniciais de linearidade do método analítico foram realizados por injeção das soluções padrão para estudo de linearidade (SPEL), apresentadas em 5.2.3.5.2.

A gama de trabalho final do método foi avaliada por injeção das soluções padrão de trabalho para validação (SPTV), descritas em 5.2.3.6.2.

Os resultados obtidos foram tratados através de uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, de acordo com a norma ISO 8466-1, obtendo-se uma reta de calibração (área vs concentração). A estes resultados foram aplicados vários testes estatísticos, nomeadamente, a análise de resíduos, teste das áreas normalizadas o teste de RIKILT e o teste de Mandel.

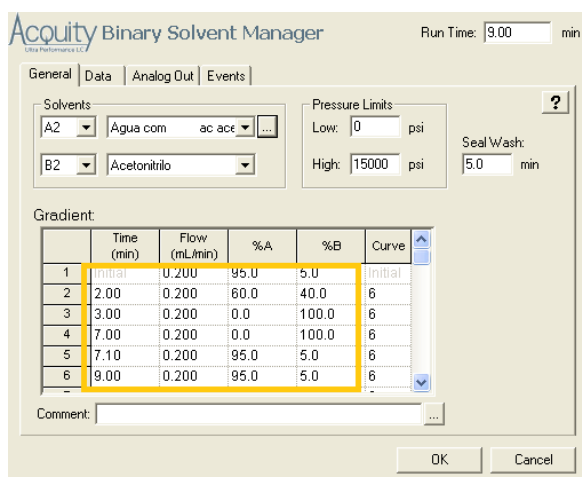
Os critérios de aceitação internos estabelecidos para aceitação dos resultados foram:

- Coeficiente de Determinação ( $R^2$ )  $\geq 0,995$ ;
- Coeficiente de Variação do método ( $CV_m$ )  $\leq 15\%$ ;
- Análise de resíduos  $\pm 10\%$ ;
- Valor do teste de RIKILT  $\geq 90\%$  e  $\leq 110\%$ ;
- Teste de Mandel VT  $< F$
- Valor do teste das áreas normalizadas  $\geq 85\%$  e  $\leq 115\%$ ;

Ao longo da gama de trabalho foi estudada a variabilidade da razão MRM1/MRM2, um dos fatores usados como critério de qualificação.

#### 5.2.5.1. Condições Cromatográficas

A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna ACQUITY UPLC BEH C8 (1,7  $\mu\text{m}$ ; 2,1mm x 100 mm), utilizando como fase móvel um gradiente de água com 0,2% de ácido acético (solvente A), e acetonitrilo (solvente B), como se pode observar na figura 19.



**Figura 19** - Gradiente da fase móvel e coluna cromatográfica ACQUITY UPLC BEH C8.

Na tabela 18, encontram-se apresentadas as condições cromatográficas otimizadas e utilizadas na validação do método.

**Tabela 18** - Condições cromatográficas otimizadas e utilizadas na validação do método.

Condições cromatográficas	
Volume de injeção	20 µl
Fluxo do eluente	0,2 mL/min
Tempo de análise	9 min
Temperatura da coluna	40 °C

#### 5.2.5.2. Condições do Espectrômetro de Massa

##### 5.2.5.2.1. Condições do “MS Method”

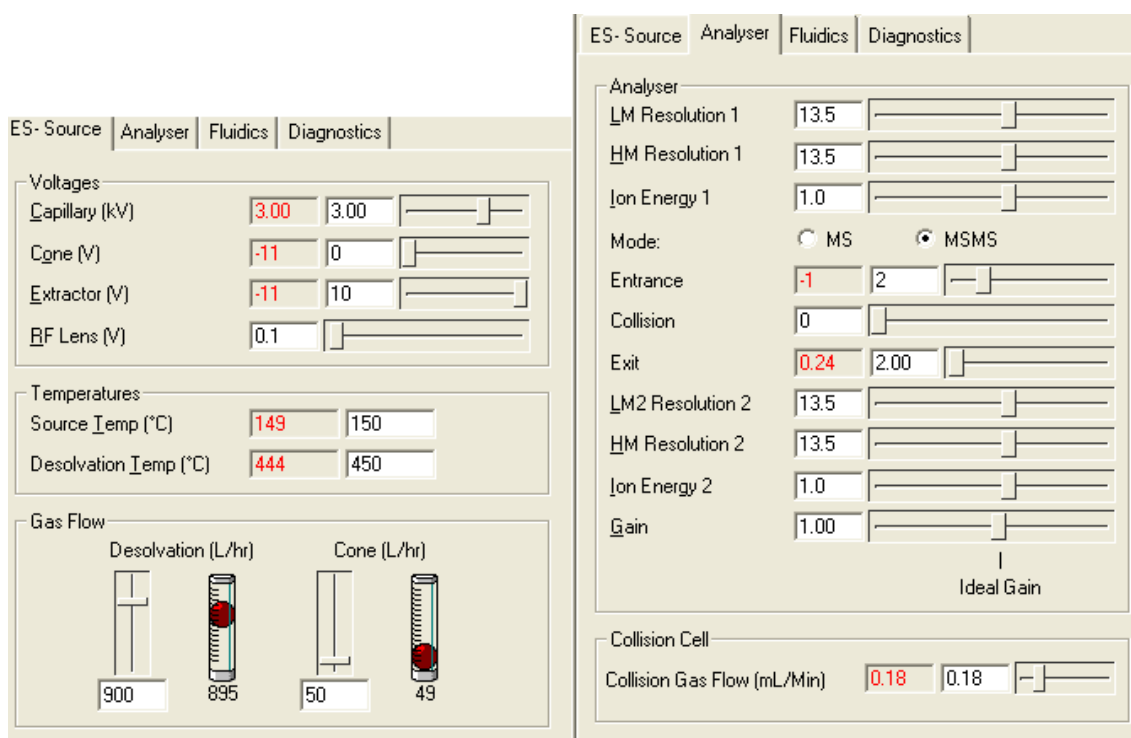
Nesta altura temos os dados necessários para definir no *software* do equipamento, o método para análise dos HAAs. As voltagens de cone utilizadas para a formação do ião precursor para cada composto, bem como os iões produto referentes às transições de quantificação (MRM1) e de qualificação (MRM2) e as respectivas energias de colisão são apresentadas na tabela 19.

**Tabela 19** – Método criado no *software* do equipamento para análise dos compostos por UPLC-ESI-MS/MS.

HAAs	Janela de retenção (min)	Voltagem de cone (V)	Transição MRM Ião Precursor - Ião Produto		Energia de Colisão (eV)
MCAA	1,5 – 2,6	15	MRM1	92,9 → 35,2	12
			MRM2	92,9 → 37,2	8
DCAA	1,5 – 2,7	20	MRM1	126,9 → 83,2	10
			MRM2	126,9 → 35,4	17
MBAA	1,6 – 2,8	15	MRM1	136,9 → 79,1	12
			MRM2	138,9 → 81,1	12
BCAA	1,7 – 3,0	15	MRM1	172,8 → 129,2	10
			MRM2	172,8 → 81,2	15
DBAA	1,8 – 3,2	15	MRM1	216,8 → 173,1	11
			MRM2	216,8 → 79,2	18
TCAA	2,2 – 3,5	20	MRM1	160,9 → 177,2	7
			MRM2	162,9 → 119,2	6
BDCAA	2,3 – 3,6	25	MRM1	208,9 → 165,1	7
			MRM2	206,9 → 163,2	7

#### 5.2.5.2.2. Condições de Operação da *Tune Page*

Na *Tune Page* foram programadas as seguintes condições referentes à fonte de ionização em *Electrospray* no modo negativo, e ao analisador de massa. Os valores utilizados tiveram como base os valores *standard* do equipamento, que se encontram apresentados na figura 20.



**Figura 20** – Condições da *tune page* da fonte de ionização e do analisador de massa.

### 5.2.5.3. Limiares Analíticos

Os limites de detecção e de quantificação instrumentais foram obtidos por injeção da solução padrão de trabalho para validação (SPTV), descrita em 5.2.3.6.2., equivalente ao padrão mais baixo da gama de trabalho para cada HAA, em condições de repetibilidade (n=10). Estes limiares analíticos foram também obtidos a partir do desvio padrão residual da reta de calibração de cada HAA.

### 5.2.5.4. Precisão em Condições de Repetibilidade

A precisão instrumental foi estudada em condições de repetibilidade (n=10). Para a avaliação da repetibilidade instrumental na gama de trabalho foram analisadas as soluções padrão conjunta para o estudo da precisão (SPCEP), descrita em 5.2.3.7.

#### **5.2.5.5. Precisão Intermédia**

A precisão intermédia foi estudada em diferentes dias de análise, por injeção da solução padrão conjunta para o estudo de precisão (SPCEP), apresentada em 5.2.3.7.

#### **5.2.6. Etapa de Concentração da Amostra**

Com o objetivo de baixar os limites de determinação do método instrumental introduziu-se uma etapa, com um sistema de evaporação em corrente de azoto, no *Turbo Vap*. A otimização desta etapa de preparação da amostra foi efetuada através de estudos de recuperação de amostras, usando diferentes valores de pressão de azoto (0,4, 0,5 e 0,6 bar) e diferentes valores de temperatura do banho de água (40, 50 e 60 °C). Nestes estudos utilizaram-se as soluções padrão da etapa de concentração da amostra (SPECA), apresentada em 5.2.3.8., as quais foram transferidas para tubos de concentração do *Turbo Vap* contendo um volume de amostra de 10 mL. Estas amostras fortificadas foram concentradas até um volume final de 1 mL.

#### **5.2.7. Efeito de Matriz**

O efeito da matriz deve ser avaliado durante o processo de validação do método. Neste estudo utilizaram-se as soluções para efeito de matriz (SPEM), descritas em 5.2.3.9., com três níveis de fortificação em diferentes amostras: água da torneira e água ultra pura. Em paralelo foram efetuados ensaios em branco da matriz em estudo de forma a efetuar a correção dos resultados obtidos com as amostras fortificadas. Para cada nível de fortificação determinou-se a percentagem de recuperação para cada composto em estudo. De seguida calculou-se o valor médio e variabilidade dos resultados (CV %). Foram realizados 6 ensaios para cada nível de fortificação.





## Capítulo 6 – Apresentação e Discussão de Resultados

### 6.1. Método Analítico SPME-GC/ITMS

#### 6.1.1. Otimização das Condições Cromatográficas

Com o intuito de se obter uma boa separação e resolução cromatográfica de todos os HAAs, construiu-se um programa de temperatura com base em resultados apresentados na literatura (5, 6, 62-64).

Neste trabalho não houve necessidade de se efetuar uma otimização das condições cromatográficas, pois após a análise da mistura de HAAs obteve-se cromatogramas com os picos bem resolvidos.

Em primeiro lugar, começou por se injetar cada solução individual de cada HAA no GC-ITMS, usando as condições indicadas em 5.1.3.2.1., por forma a determinar o tempo de retenção de cada composto. Na tabela 20, encontra-se apresentado o tempo de retenção de cada HAA.

**Tabela 20-** Tempos de retenção dos HAAs.

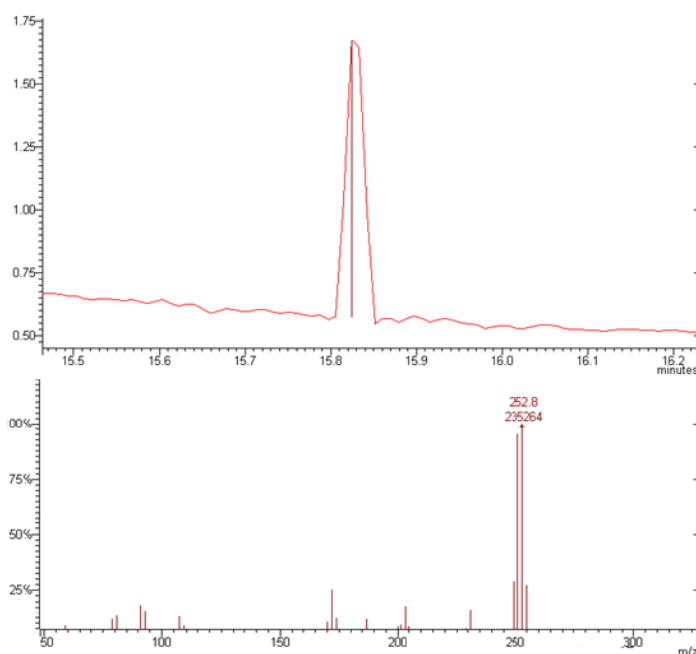
Ácidos Haloacéticos	<i>tr</i> (min)
MCAA	3,63
MBAA	5,33
DCAA	5,73
TCAA	9,46
BCAA	9,57
DBAA	12,7
BDCAA	12,91
CDBAA	14,65
TBAA	15,83

### 6.1.2. Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa

Na cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa, as formas de ionização frequentemente utilizadas são a electroionização e a ionização química. Neste trabalho começou por se testar a electroionização.

No ITMS, existem várias formas de aquisição *full scan*, SIM e MS/MS. Neste trabalho foi testado o modo MS/MS uma vez que este apresenta maior sensibilidade comparativamente com os anteriormente descritos. A otimização das condições do MS foi efetuada por injeção líquida da solução padrão conjunta descrita em 5.1.3.2.2.

Qualquer método MS/MS inicia-se pela escolha dos iões precursores característicos de cada composto alvo. A escolha é feita tendo em conta a intensidade de sinal dos iões resultantes do processo de ionização, ou seja, escolheu-se o ião com uma determinada razão  $m/z$  cuja contribuição para a área global fosse mais significativa. Na figura 21, encontra-se representado um espectro de massa do TBAA obtido por electroionização.



**Figura 21** – Espectro de massa do TBAA obtido por electroionização.

Na tabela 21, encontram-se descritos os iões precursores característicos de cada HAA obtidos por electroionização.

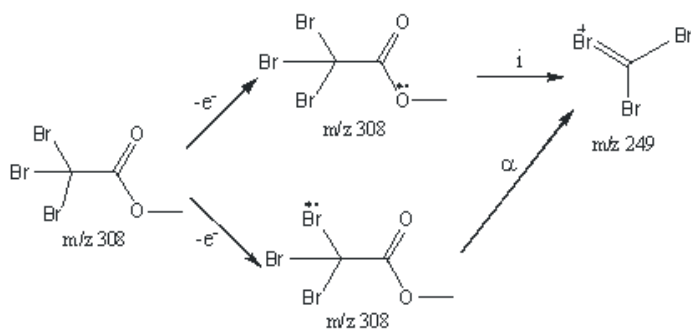
**Tabela 21** – Ião precursor de cada HAA, obtido por electroionização.

Ácidos Haloacéticos	Ião Precursor ( <i>m/z</i> )
MCAA	77
MBAA	93
DCAA	83
TCAA	119
BCAA	129
DBAA	173
BDCAA	163
CDBAA	207
TBAA	253

Com o objetivo de determinar as energias de excitação características de cada ião precursor, foram aplicados diferentes valores de energia por forma a obter os iões produtos característicos de cada composto alvo. No entanto, com o aumento da energia de excitação não se observou a formação de iões produtos, observando-se apenas, à medida que a energia aumenta, o aparecimento de um ruído cromatográfico.

Estes resultados podem ser justificados com base no tipo de ião precursor, uma vez que, o ião precursor seleccionado resulta de uma fragmentação do ião molecular durante o processo de electroionização, dificultando assim uma segunda fragmentação.

Na figura 22, encontra-se descrito um mecanismo de ionização por electroionização do TBAA.

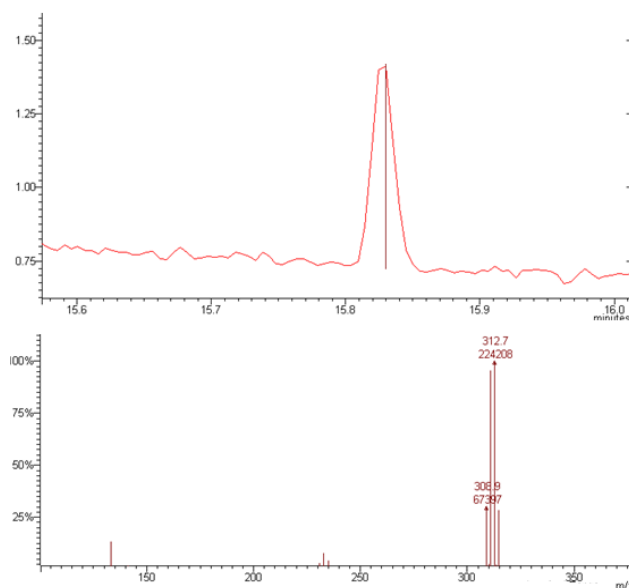


**Figura 22** – Mecanismo de ionização por electroionização para o TBAA.

Tendo em conta o exposto, não foi possível desenvolver o método MS/MS utilizando a electroionização.

Com base nos conceitos teóricos, o modo de ionização química é considerado mais suave comparativamente com a electroionização, diminuindo assim a probabilidade de fragmentação dos compostos na etapa de ionização.

Desta forma, foi testado o modo de ionização química por injeção líquida de uma solução de cada HAA descrita em 5.1.3.2.1., o que permitiu a escolha dos iões precursores resultantes da ionização química. Na figura 23, encontra-se representado um espectro de massa do DCAA obtido por ionização química.



**Figura 23** – Espectro de massa do TBAA obtido por ionização química.

Na tabela 22, encontram-se apresentados os iões precursores característicos de cada HAA, resultantes da ionização química.

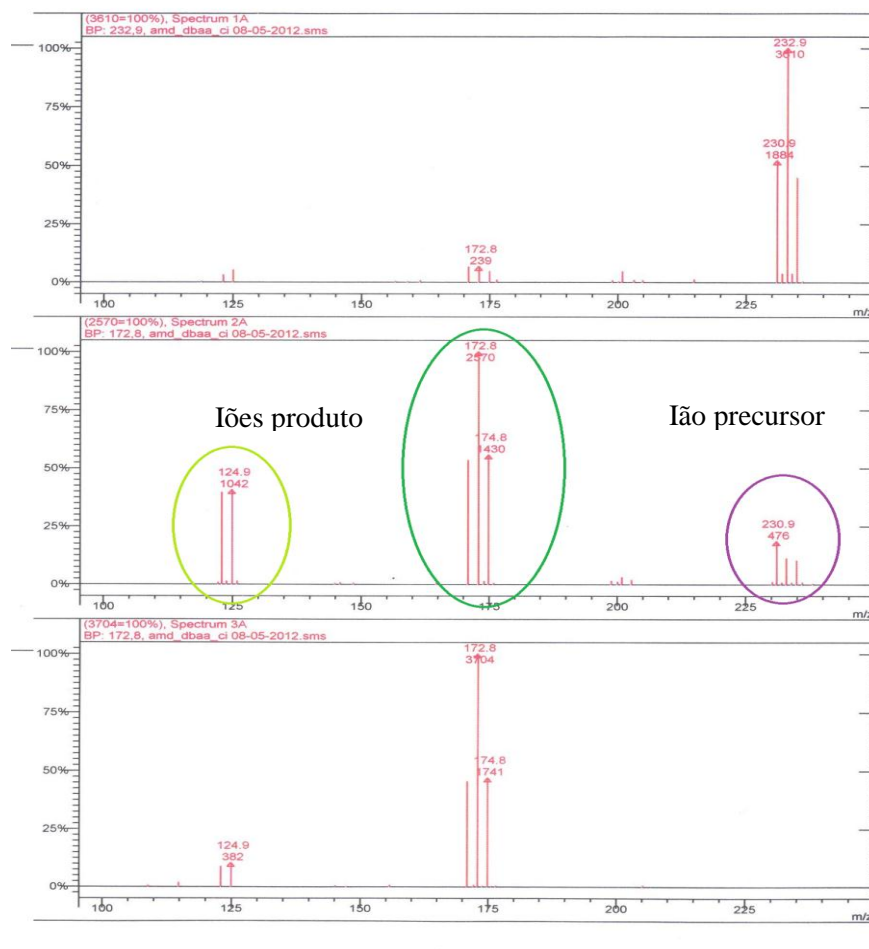
**Tabela 22** - Ião precursor de cada HAAs obtido por ionização química.

Ácidos Haloacéticos	Ião Precursor ( $m/z$ )
MCAA	109
MBAA	153
DCAA	143
TCAA	177
BCAA	187
DBAA	233
BDCAA	223
CDBAA	267
TBAA	311

Neste modo de ionização os iões obtidos correspondem ao ião molecular protonado de cada composto.

Após a determinação dos respetivos iões precursores, foi desenvolvido o método AMD fazendo variar a energia de excitação de modo a fragmentar o ião precursor e a se obter os iões produto de cada HAA. Observou-se que por variação da energia de excitação (CID), se obtinha espectros de massa onde se ia verificando o aparecimento dos iões produtos e o desaparecimento da intensidade de sinal do ião precursor, como se pode observar na figura 24. Efetuou-se a variação da energia de excitação em incrementos reduzidos por forma a determinar energia de excitação adequada para cada composto.

As energias de excitação variam de composto para composto, e no caso dos compostos trihalogenados é necessário a aplicação de um valor mais elevado de energia de forma a ser possível a sua fragmentação.



**Figura 24** - Espectro do método AMD do DBAA.

Na tabela 23 encontra-se um resumo dos parâmetros do modo aquisição MS/MS para a detecção dos HAAs no espectrómetro de massa.

**Tabela 23** – Resumo dos parâmetros do modo MS/MS para a detecção dos HAAs.

Ácidos Haloacéticos	<i>tr</i> (min)	Ião precursor ( <i>m/z</i> )	Nível de armazenamento de excitação ( <i>m/z</i> )	CID (V)	Iões produto ( <i>m/z</i> )
MCAA	3,63	109	48	36	<b>77, 79</b>
MBAA	5,33	153	67,4	49	<b>121, 123</b>
DCAA	5,73	143	63	44	<b>75, 79</b>
TCAA	9,46	177	78	42	<b>109, 113</b>
BCAA	9,57	187	82,4	62	<b>123, 125</b>
DBAA	12,7	233	102,6	78	123, 175, <b>173</b>
BDCAA	12,91	223	98,2	53	109, 133, <b>159</b>
CDBAA	14,65	267	117,6	70	157, <b>159</b> , 203
TBAA	15,83	311	137	85	153, <b>203</b>

Os iões a negrito, apresentados na tabela 23, são utilizados na quantificação do respetivo composto.

O modo MS/MS em comparação com o modo *full scan*, apresenta uma maior seletividade e sensibilidade, o que o torna numa importante ferramenta na análise de matrizes complexas.

### 6.1.3. Otimização das Condições de SPME-GC-ITMS

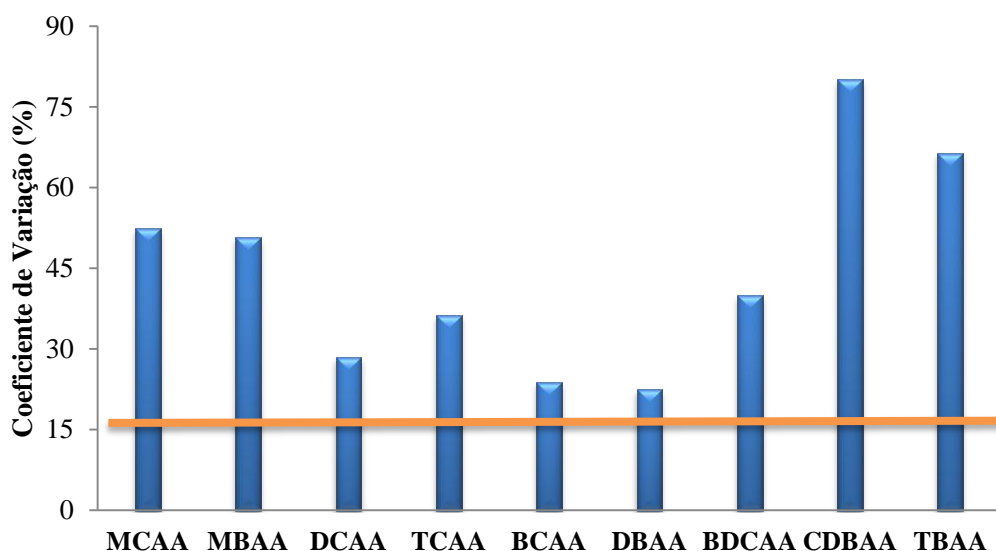
Antes de se efetuarem os ensaios necessários para a validação de um método analítico, é imprescindível a otimização de alguns parâmetros durante o seu desenvolvimento. Neste sentido, os estudos nesta fase foram conduzidos tendo por objetivo otimizar os parâmetros da técnica de SPME, os quais apresentam elevada importância na extração dos analitos de uma matriz.

Para proceder à análise dos HAAs numa amostra de água através da técnica de GC é necessário normalmente uma etapa prévia de derivatização. Isto porque os referidos compostos apresentam baixa volatilidade e elevada polaridade (5, 6, 8, 62, 64). Para que a etapa de derivatização não interferisse com a otimização dos parâmetros de extração, a otimização da técnica de SPME foi efetuada por

fortificação em amostras de água ultra pura de uma mistura padrão contendo os ésteres metílicos dos respetivos HAAs

A otimização do processo de extração foi iniciado com o uso de uma fibra do tipo CAR-PDMS nas condições descritas em 5.1.5. Existem estudos que demonstram que este tipo de fibra apresenta resultados satisfatórios para a extração da maioria dos HAAs (48, 92).

Foram realizados 6 ensaios com as mesmas condições de trabalho indicadas na literatura com o objetivo de confirmar a seletividade apresentada pela fibra para os diferentes compostos. Após a análise dos resultados obtidos, observou-se que havia uma elevada variabilidade do sinal instrumental entre diferentes ensaios, com podemos observar na figura 25.



**Figura 25** – Variabilidade dos resultados da análise de HAA por SPME-GC-ITMS usando a fibra CAR-PDMS.

Através da representação gráfica, podemos observar que os coeficientes de variação obtidos são muito elevados comparativamente com os definidos pelos critérios de aceitação internos ( $\leq 15\%$ ), o que torna esta metodologia inapropriada à possível validação de um método analítico.

Com o objetivo de verificar se os resultados obtidos estavam relacionados com a fibra utilizada, foram realizados vários ensaios através da utilização de novas fibras de CAR-PDMS do mesmo lote e de lotes diferentes. Os resultados obtidos



apresentaram coeficientes de variação da mesma ordem de grandeza aos anteriormente apresentados.

No sentido de perceber a razão pela qual o método pré-definido apresentava elevada variabilidade, efetuaram-se inúmeros testes, procedendo-se a tentativas de otimização de diversos parâmetros de SPME: o tempo e temperatura de extração, tempo e temperatura de dessorção no injetor, velocidade de agitação, adição de diferentes concentrações do sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), temperatura da *trap*, tipo de fibra, tipo de *liner* e injeção manual.

Após inúmeras tentativas, não foi possível obter resultados com coeficientes de variação aceitáveis, o que não permitiu a otimização dos parâmetros relacionado com o processo de extração (SPME).

Na literatura científica existem estudos relacionados com a decomposição térmica dos HAAs. Um estudo demonstra que o TBAA, durante o processo de análise por GC/MS, se decompõe no injetor a temperaturas entre 170 - 250 °C, dando origem ao tribromometano (família dos THMs), e ao DBAA (93). Outro estudo demonstra que o CDBAA, BDCAA e o TBAA apresentam uma decomposição térmica à temperatura ambiente, sendo esta favorecida com o aumento da temperatura, levando à formação dos seus respetivos THMs (94). Um outro estudo demonstrou a degradação térmica dos HAAs em água, em que o grau de degradação é maior para compostos trihalogenados devido à ocorrência de um processo de descarboxilação (95).

Com base nos estudos existentes na literatura científica, pode-se justificar a falta de repetibilidade obtida nos estudos efectuados que poderá estar relacionada com a degradação térmica destes compostos durante o processo de extração por SPME e até mesmo durante a dessorção no injetor. Neste sentido, não é possível afirmar que a falta de repetibilidade esteja diretamente relacionada com as hipóteses acima apresentadas, podendo também estar relacionada com a própria repetibilidade do sistema de SPME associado ao GC-ITMS.

Em forma de conclusão, devido à falta de repetibilidade apresentada pelo método, foi necessário abandonar a metodologia analítica. Neste sentido, foram feitas algumas pesquisas (5, 6), optando-se por desenvolver o método em UPLC-ESI-

MS/MS. Nesta tecnologia não é necessária etapa prévia de derivatização dos HAAs, permitindo uma injeção direta das amostras.

## **6.2. Método Analítico UPLC-ESI-MS/MS**

O desenvolvimento de um método quantitativo de LC-MS/MS, como qualquer outro método cromatográfico, requer a otimização de vários parâmetros, tornando-se um processo moroso e dispendioso.

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e validação de um método analítico para a monitorização dos HAAs. O trabalho foi desenvolvido por otimização das condições do sistema UPLC-ESI-MS/MS com vista à sua validação e posterior implementação em rotina.

### **6.2.1. Otimização das Condições UPLC-ESI-MS/MS**

#### **6.2.1.1. Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa**

O desenvolvimento do método analítico iniciou-se pela otimização de diversos parâmetros relacionados com o espectrómetro de massa. Esta otimização teve como objetivo definir as melhores condições de monitorização, de forma a ser possível atingir o máximo de seletividade e sensibilidade para cada composto alvo.

O trabalho experimental iniciou-se pela otimização dos parâmetros relacionados com a formação do ião precursor (que ocorre na fonte de ionização), e com a formação dos iões produto (que ocorre no terceiro quadrupolo). Desta forma, foi otimizada a voltagem do cone e a voltagem do capilar na fonte de ionização e a energia de colisão na célula de colisão.

##### **6.2.1.1.1. Condições da Fonte de Ionização**

Os HAAs são compostos com propriedades acídicas pelo que, o ião precursor formado para este tipo de analitos corresponde ao ião molecular desprotonado ( $M-H$ ), ião descarboxilado ( $M-COOH$ ), e dímero ( $2M-H$ ). Por esse motivo, usou-se o

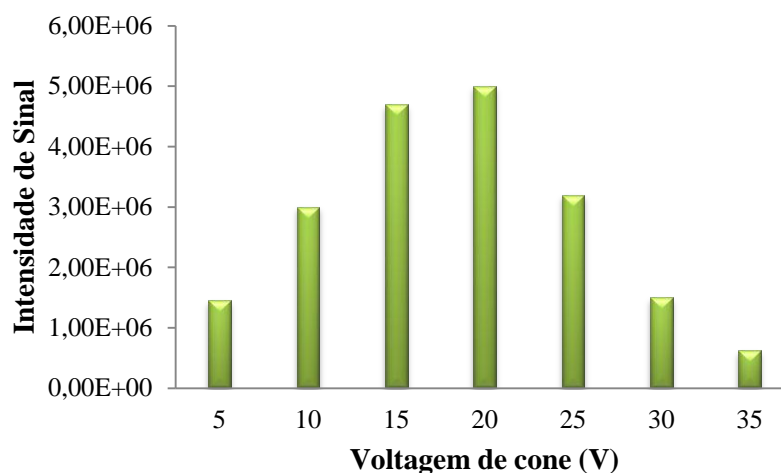
*electrospray* em modo de ionização negativo (ESI-). Na tabela 24, encontram-se representados os possíveis íons precursores para cada um dos HAAs (31, 61, 106).

**Tabela 24** – Tipos de íons precursores possíveis para os HAAs.

Tipos de íons precursores			
	Massa molecular	(M-H) <sup>-</sup> (desprotonado)	(M-COOH) <sup>-</sup> (descarboxilado)
			2(M-H) <sup>-</sup> (dímeros de íons)
MCAA	95	93	187
DCAA	129	127	257
MBAA	139	137	257
BCAA	173	173	
DBAA	218	217	
TCAA	164	163	117
BDCAA	206	207	163
CDBAA	250	251	207
TBAA	297	295	251

A partir da infusão da solução padrão individual para infusão (SPII), que se encontra descrita em 5.2.3.3.1., de cada composto, foi estudado o efeito da variação da voltagem de cone na fonte de ionização sobre a intensidade do sinal de cada íon precursor.

A figura 26 apresenta, como exemplo, a influência de variação da voltagem de cone na intensidade do sinal do íon precursor formado para o DCAA.



**Figura 26** - Variação da intensidade de sinal do DCAA com a voltagem de cone, por *electrospray* em modo de ionização negativo.

Como podemos observar a partir da figura anterior, a voltagem de cone para a formação do ião precursor correspondente ao DCAA, que conduz a um máximo de intensidade do ião precursor é a voltagem de 20 V. Para os restantes HAAs, a escolha da voltagem de cone foi feita de igual forma.

Na tabela 25, encontra-se um resumo da voltagem de cone e respetivo ião precursor escolhidos, após otimização, para cada um dos HAAs.

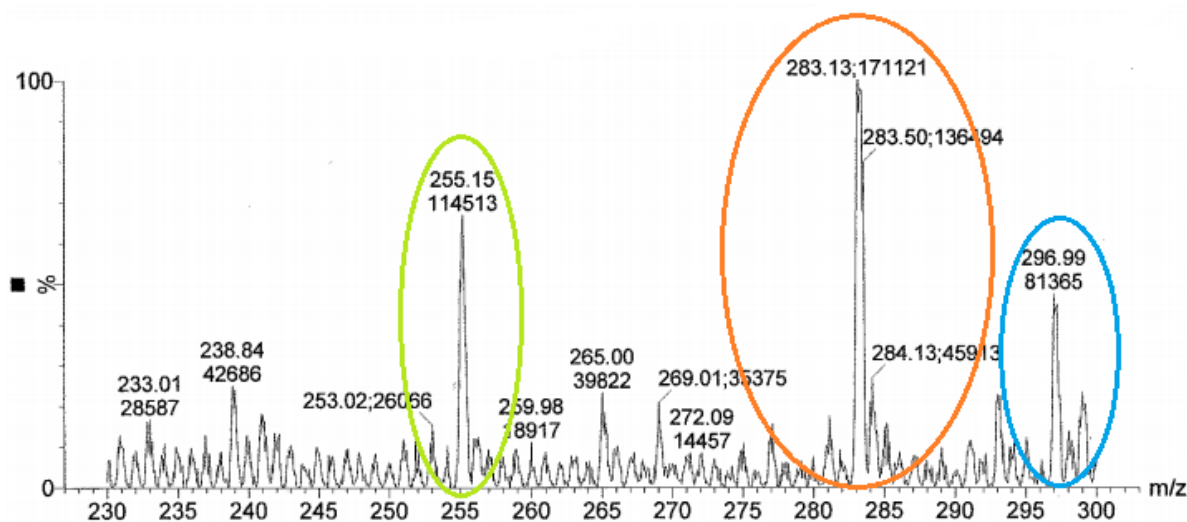
**Tabela 25** – Ião precursor e respetivas voltagens de cone para cada HAA.

Ácidos Haloacéticos	Ião precursor	Voltagem de Cone (V)
MCAA	92,9	15
DCAA	126,9	20
MBAA	136,9	15
BCAA	172,8	15
DBAA	216,8	15
TCAA	162,9	20
BDCAA	206,9	20
CDBAA	250,7	25

Como podemos observar por comparação das tabelas 24 e 25, de uma forma geral, verificou-se que a massa do ião precursor corresponde à massa molecular do composto desprotonado  $(M-H)^-$ . Para os compostos TBAA, TCAA, CDBAA e BDCAA a massa do ião precursor com maior intensidade de sinal corresponde à massa molecular do composto descarboxilado  $(M-COOH)^-$ . No caso do TCAA, não foi possível a escolha do ião precursor correspondente ao fragmento descarboxilado ( $m/z$  117), dado que este fragmento também surgia no branco da água ultra pura. Deste modo, optou-se pela escolha do ião molecular desprotonado ( $m/z$  163).

No caso do TBAA, quando se fez a infusão observou-se uma baixa sensibilidade instrumental para a deteção deste composto, verificando-se uma extensa fragmentação na fonte de ionização após a aplicação de diversos valores de voltagens de cone, como se verifica por análise da figura 27.

Este facto impede, a escolha de um ião precursor adequado para este composto e, posteriormente dos seus respetivos iões produto, dado que a sensibilidade analítica fica bastante reduzida. Por este motivo, foi abandonada a otimização e validação do TBAA por este método analítico.



**Figura 27-** Espectro de massa do ião precursor do TBAA no modo de ionização negativo, para uma voltagem de cone de 15 V.

#### 6.2.1.1.2. Condições do Triplo Quadrupolo

Após a otimização das condições de ionização é necessário recorrer à otimização dos parâmetros de operação do analisador de massa.

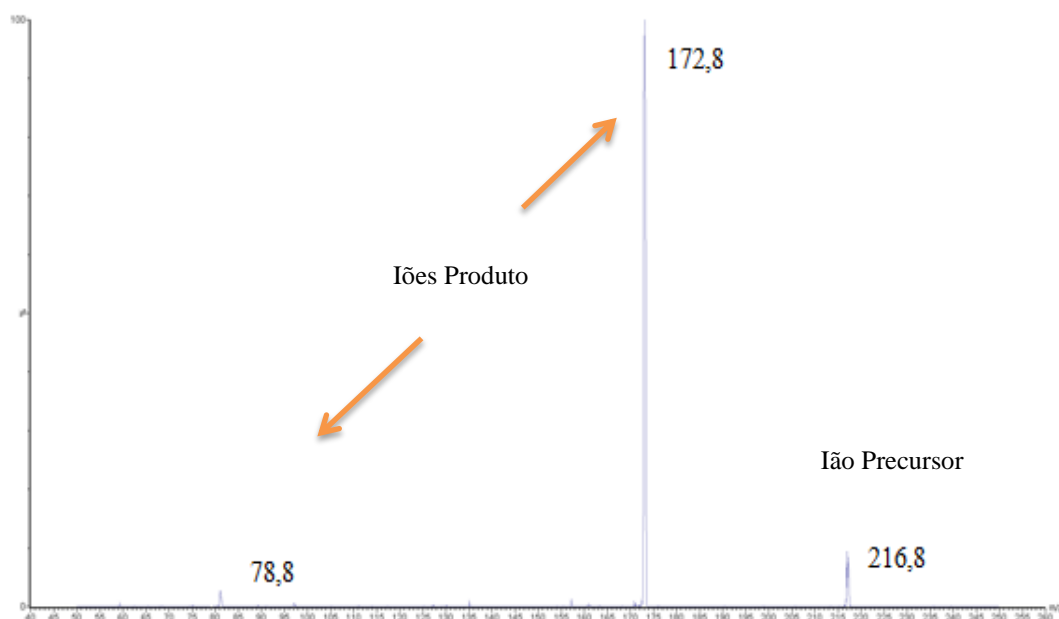
O modo de operação do triplo quadrupolo a ser utilizado em rotina é o modo MRM, para alcançar a seletividade e a sensibilidade necessária para a análise dos HAAs existentes nas amostras de água de consumo.

No modo de operação MRM é feito normalmente a escolha de duas transições (ião precursor e ião produto), utilizando-se a transição MRM1 para a análise quantitativa e a transição MRM2 para a qualificação, permitindo assim a confirmação de um determinado composto em estudo.

Deste modo, torna-se imprescindível a escolha dos iões produtos de cada HAA de forma a obter as duas transições MRM. Para tal, começou-se por otimizar a energia de colisão necessária para a fragmentação dos iões precursores de cada um dos analitos em estudo. Esta otimização foi efetuada por análise das soluções padrão apresentadas na em 5.2.3.3.1. No caso concreto de se utilizar um analisador de massa do tipo triplo quadrupolo, para ser possível a identificação dos iões produto, é necessário trabalhar em modo *Product Ion Scan*. Neste modo, o primeiro quadrupolo funciona em modo SIM onde ocorre a seleção de um ião precursor e o terceiro quadrupolo funciona em modo *Full Scan*.

Em geral, o aumento da energia de colisão promove um aumento da fragmentação do ião precursor dando origem aos iões produto. A energia de colisão ótima é aquela que permite a formação de dois iões produtos com o maior valor de intensidade de sinal, mas em que ainda seja detetado o ião precursor, de forma a garantir que os fragmentos originados provêm do respetivo ião precursor.

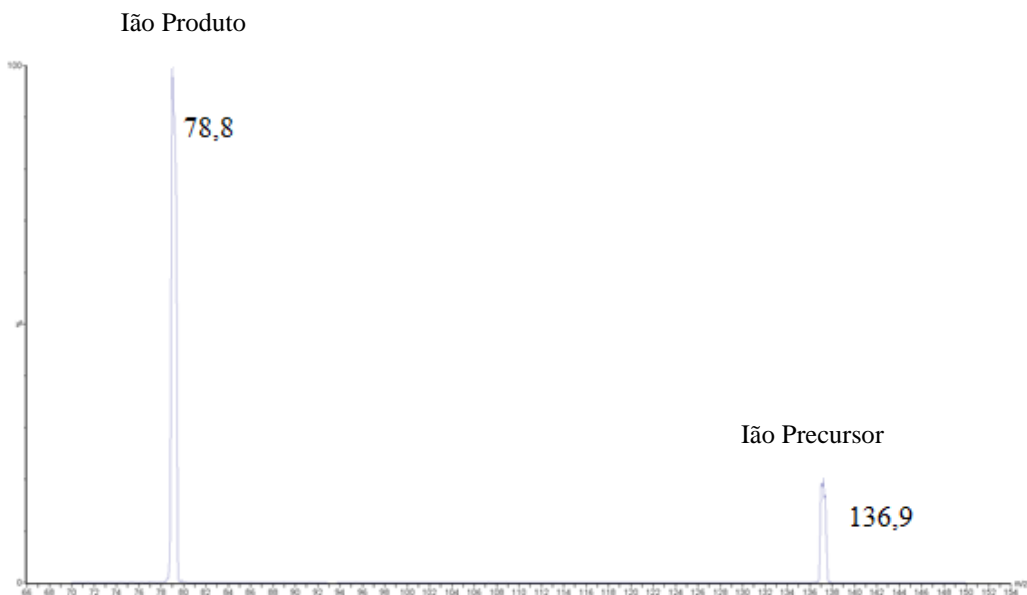
Na figura 28, encontra-se o espectro de massa do DBAA obtido no modo de operação *Product Ion Scan*.



**Figura 28** - Espectro de massa do DBAA obtido no modo de operação *Product Ion Scan*

Como podemos observar, existe a presença de dois iões produto, com diferentes intensidades de sinal, sendo escolhido o ião de razão  $m/z$  172,8 para a transição MRM1 (quantificação), e o ião de razão  $m/z$  78,8 para a transição MRM2 (qualificação).

No entanto, este comportamento não é verificado para todos os compostos em estudo. No caso do MCAA e MBAA, ocorre apenas a formação de um único ião produto, a partir do ião precursor selecionado, qualquer que seja a energia de colisão aplicada, como se pode observar na figura 29.



**Figura 29** - espectro de massa do MBAA obtido no modo de operação *Product Ion Scan*.

O facto destes compostos apresentarem apenas uma fragmentação poderá estar relacionado com a sua baixa massa molecular, que não lhes permite originar diversos fragmentos.

O MCAA e o MBAA apresentam na sua estrutura química átomos halogenados, cloro e bromo, respetivamente. O espectro de massas do ião precursor do MCAA obtido por *electrospray*, em modo negativo, durante o processo de otimização da voltagem de cone, permite identificar iões de massa equivalente à presença dos isótopos do cloro  $^{35}\text{Cl}$  e  $^{37}\text{Cl}$ . Do mesmo modo, o espectro de massas do ião precursor do MBAA apresentava os iões de massa equivalente à presença dos isótopos do bromo  $^{79}\text{Br}$  e  $^{81}\text{Br}$ . Sendo assim, de modo a termos duas transições MRM para cada composto, optamos por escolher dois iões precursores diferentes equivalentes aos respetivos isótopos do cloro e do bromo de cada um destes compostos. Procedeu-se do mesmo modo, para o TCAA e o BDCAA, devido à baixa intensidade de sinal obtido no espectro de massa para a segunda transição.

A energia de colisão selecionada para cada composto foi a que conduzia à formação dos iões produtos de cada HAA com maior intensidade de sinal no espectro de massas. As duas transições selecionadas para cada composto, bem como as energias de colisão aplicadas, estão descritas na tabela 26.



**Tabela 26** - Resumo das condições ótimas para definição das transições MRM1 e MRM2 para cada HAA.

Ácidos Haloacéticos	Transição MRM ( <i>m/z</i> ) Ião Precursor - Ião Produto		Energia de Colisão (eV)
MCAA	MRM1	92,9→34,9	12
	MRM2	94,9 → 36,9	8
DCAA	MRM1	126,9 → 82,9	10
	MRM2	126,9 → 34,9	17
MBAA	MRM1	136,9 → 78,8	12
	MRM2	138,9 → 80,8	12
BCAA	MRM1	172,8 → 129,2	10
	MRM2	172,8 → 81,2	15
DBAA	MRM1	216,8 → 172,8	11
	MRM2	216,8 → 78,8	18
TCAA	MRM1	160,9 → 116,8	7
	MRM2	162,9 → 118,9	6
BDCAA	MRM1	206,9 → 162,8	7
	MRM2	208,9 → 164,8	7

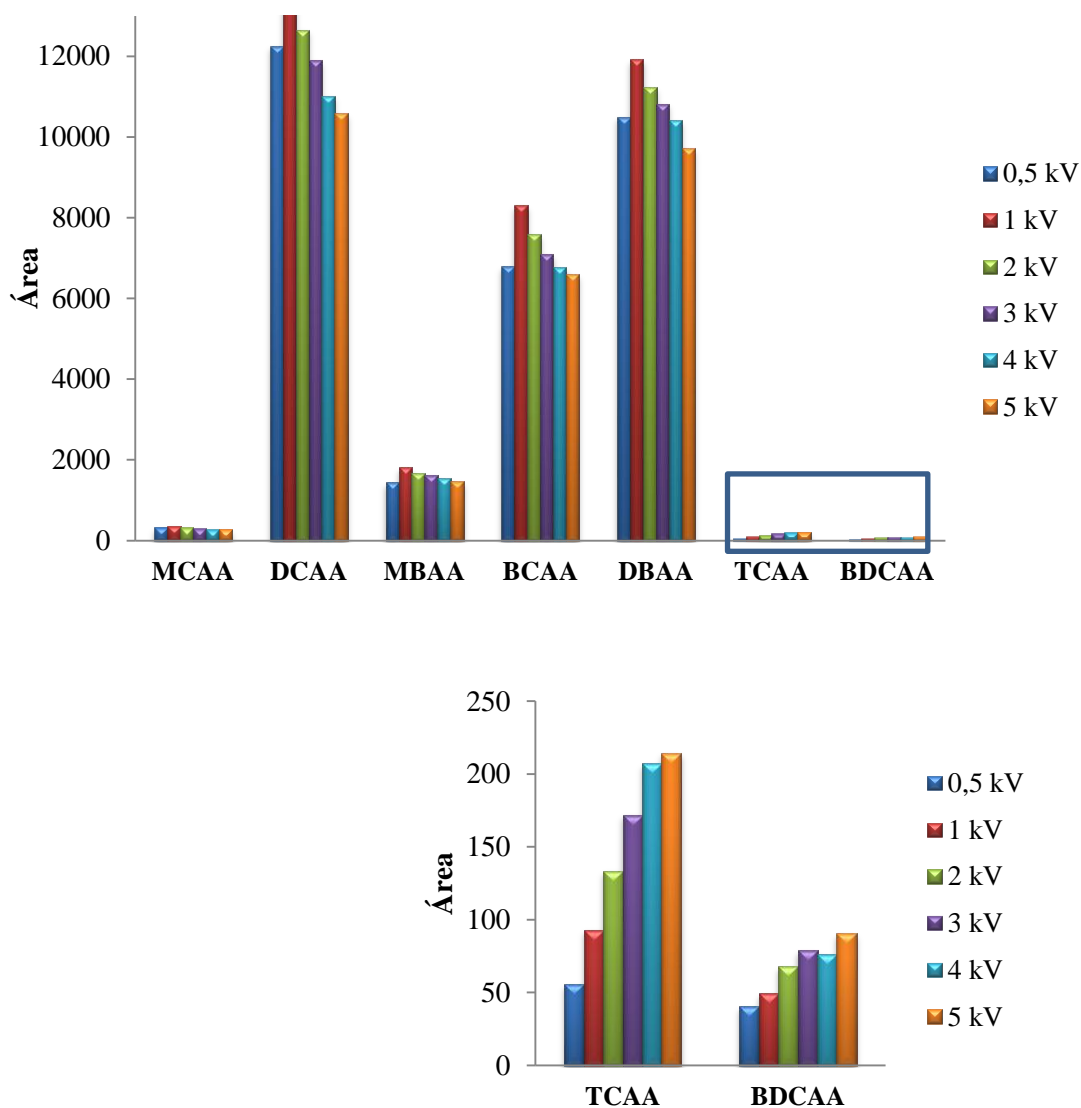
No caso específico do CDBAA, após escolha do ião precursor que apresentava maior intensidade de sinal, a sua análise em modo MRM não foi possível devido à baixa sensibilidade de sinal instrumental obtido para este composto. Neste sentido, foi necessário abandonar a monitorização deste composto por este método analítico.

#### 6.2.1.1.3. Otimização da Voltagem de Capilar

A voltagem aplicada no capilar para formar os respetivos iões precursores correspondentes a cada HAAs, foi testada entre 0,5 e 5 kV em modo negativo. Como se pode observar na figura 30, a intensidade de sinal é maior com 1 kV para a

maioria dos compostos, apresentando No entanto, para os compostos com menor sensibilidade (TCAA e BDCAA), é melhor um potencial de 5 kV.

Contudo, como é necessário a escolha de um determinado valor de voltagem de capilar que é constante para todos os compostos optou-se por escolher 5 kV, dado que este valor favorece a intensidade do sinal para os compostos com menor sensibilidade, não influenciando de forma drástica o sinal dos compostos com maior sensibilidade.



**Figura 30** - Efeito da variação da voltagem do capilar no sinal instrumental obtido para cada HAAs.

Depois de terem sido feitos alguns estudos observou-se que a aplicação de um potencial elevado (5kV), conduz a um aumento da sujidade do cone, diminuindo a sensibilidade do equipamento. Deste modo, seria necessário recorrer a uma manutenção regular, tornando-se uma enorme desvantagem para a utilização do método em rotina.

Optou-se, então, por escolher uma voltagem de capilar de 3 kV, tendo sido esta a voltagem utilizada na implementação do método analítico.

### **6.2.2. Otimização das Condições Cromatográficas**

Depois de se terem determinado as condições de monitorização de cada analito, foi injetado individualmente cada composto descritas em 5.2.3.4.1., nas condições apresentadas na secção 5.2.4.2., de forma a determinar o tempo de retenção e avaliar a existência de algum tipo de interferente.

#### **6.2.2.1. Otimização das Condições de Temperatura da Coluna e Fluxo da Fase Móvel**

A temperatura da coluna e o fluxo da fase móvel são parâmetros que interferem diretamente na qualidade de separação cromatográfica.

De um modo geral, a temperatura da coluna influencia o processo de transferência de massa. O aumento da temperatura leva à diminuição da viscosidade da fase móvel permitindo uma maior difusão dos analitos, e consequentemente aumenta o processo de transferência de massa aumentando a sensibilidade do método cromatográfico.

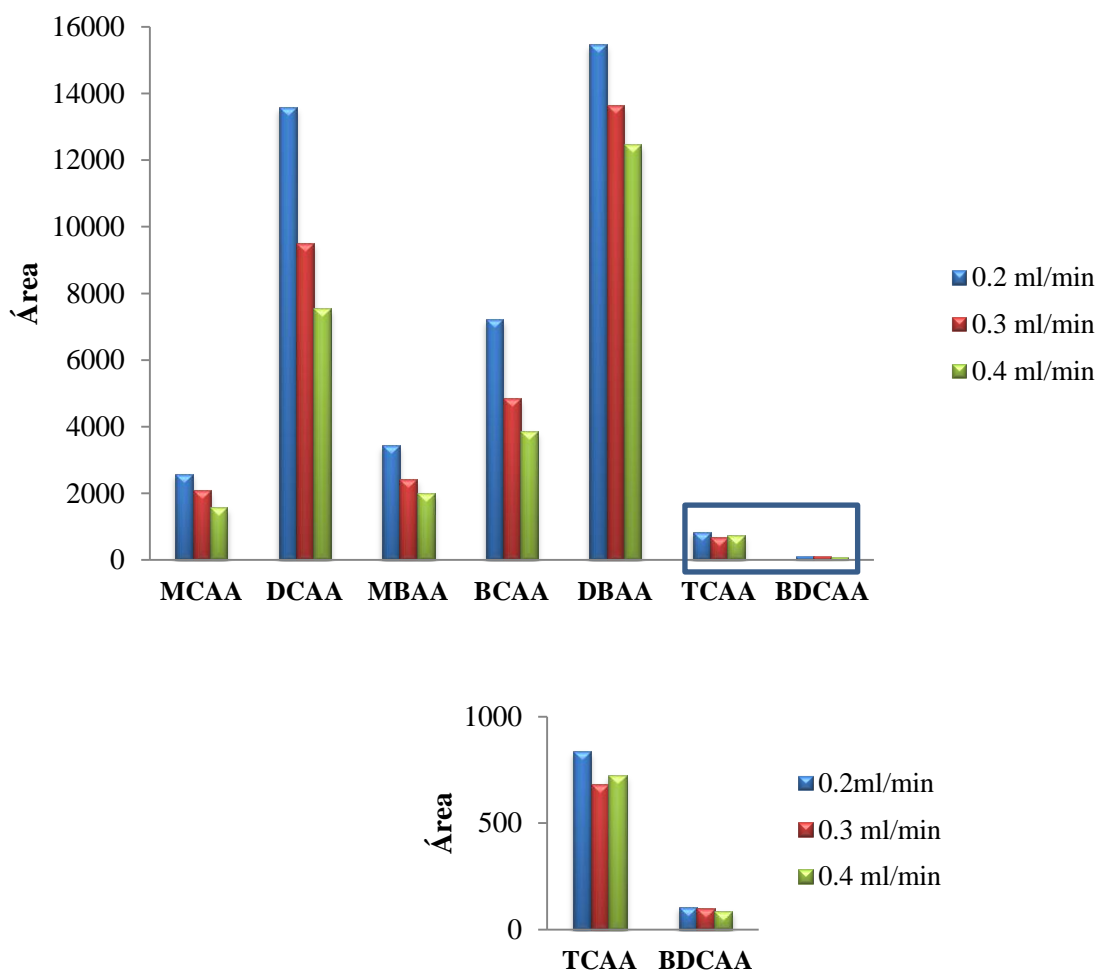
No caso específico da análise dos HAAs, a temperatura da coluna não afetou a sensibilidade dos analitos em estudo, verificando-se exclusivamente uma diminuição dos tempos de retenção. As temperaturas de coluna testadas foram 30, 40 e 50 °C. Quando se utiliza uma temperatura de 30 °C a eluição dos compostos na coluna é mais rápida diminuindo os seus tempos de retenção. Este facto pode ter influência na seletividade do método caso existam interferentes presentes na matriz. A utilização de uma temperatura de 50 °C pode ser prejudicial devido ao facto de se

estar a trabalhar perto do limite de temperatura da coluna (60 °C). Deste modo, optou-se por uma temperatura de 40 °C.

O fluxo da fase móvel interfere com a interação dos analitos com a fase estacionária. Ou seja, de acordo com a velocidade com que a fase móvel passa pela coluna, altera o tempo de interação dos analitos com a fase estacionária, e consequentemente modificando a eficiência do processo de separação.

Os valores de fluxo da fase móvel que são apresentados na literatura para este tipo de analitos são variáveis (5, 6). No presente trabalho optou-se por testar vários fluxos, nomeadamente, 0,2, 0,3 e 0,4 mL min<sup>-1</sup>.

Na figura 31, encontra-se representado sobre a forma de gráfico a influência do fluxo da fase móvel no sinal instrumental obtido para os respetivos HAAs.



**Figura 31** – Efeito do fluxo da fase móvel na sensibilidade dos HAAs.

Por análise dos resultados obtidos, optou-se por escolher um fluxo da fase móvel de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ , dado que foi o que demonstrou ter uma maior sensibilidade para todos os compostos.

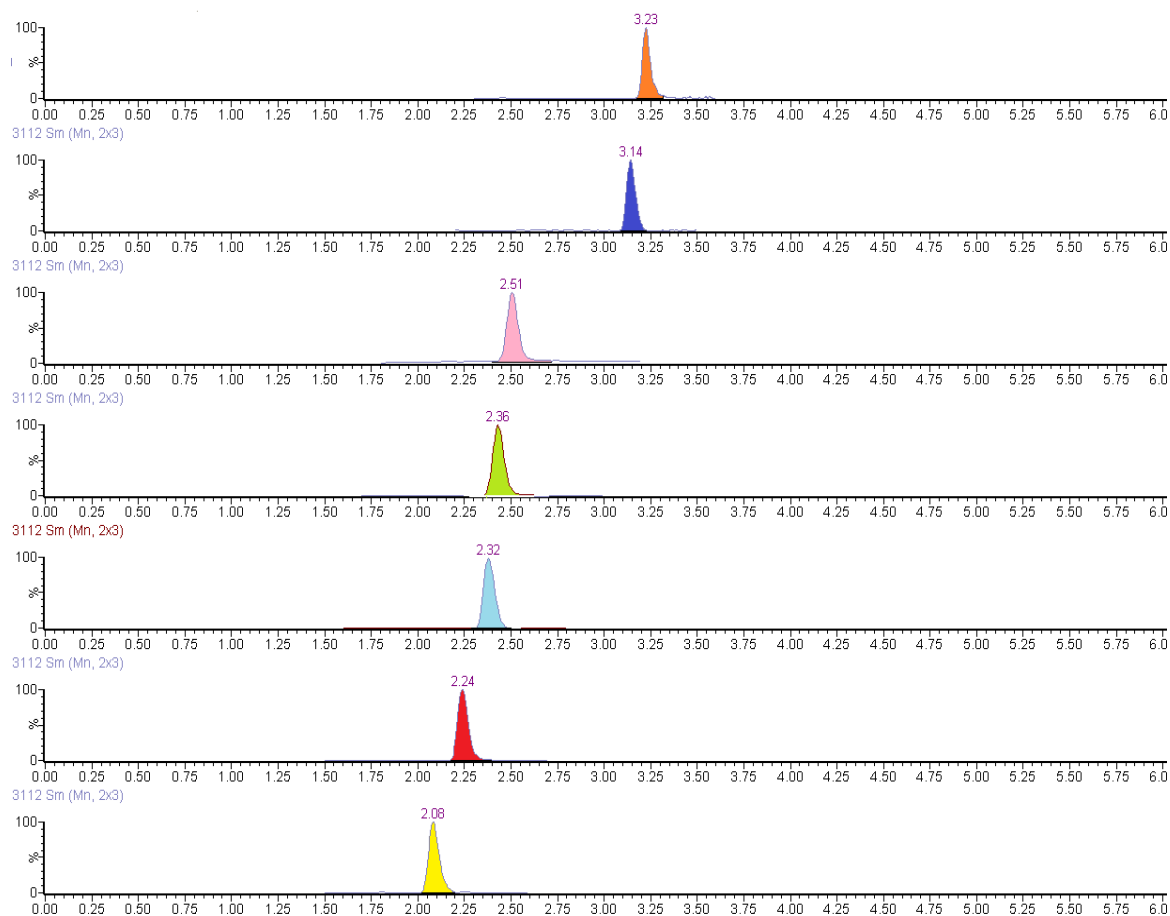
#### **6.2.2.2. Otimização do Volume de Injeção**

O volume de injeção de amostra deve ser reduzido para evitar o alargamento do pico cromatográfico. Para isto, os equipamentos de UPLC possuem uma faixa de volume de injeção entre 0,1 e 50  $\mu\text{L}$  (73). O volume de injeção máximo apresentado pelo equipamento em uso é de 20  $\mu\text{L}$ . Neste sentido, foram testados 4 volumes de injeção diferentes 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{L}$ .

Os resultados obtidos demonstraram que o aumento do volume de injeção causava um aumento da sensibilidade dos compostos em estudo. Paralelamente, efetuou-se a análise do perfil cromatográfico, tendo-se observado um bom perfil cromatográfico. Neste sentido, concluiu-se que não ocorre saturação da coluna com o aumento do volume de injeção, pelo que o volume de injeção escolhido foi de 20  $\mu\text{L}$ .

As otimizações cromatográficas foram feitas recorrendo à utilização de uma solução conjunta dos HAA apresentada na sessão 5.2.3.4.2.

Na figura 32, encontra-se o cromatograma da solução padrão conjunta resultante das transições MRM1 para cada composto, nas condições cromatográficas previamente otimizadas.



**Figura 32** – Cromatograma obtido por injeção de uma solução padrão conjunta dos HAAs, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção.

Após otimização das condições cromatográficas e do espectrómetro de massa, cada composto foi injetado de forma individual de modo a garantir que não havia qualquer interferência desse composto nas transições selecionadas para os outros compostos alvo.

### 6.2.3. Validação do Método UPLC-ESI-MS/MS

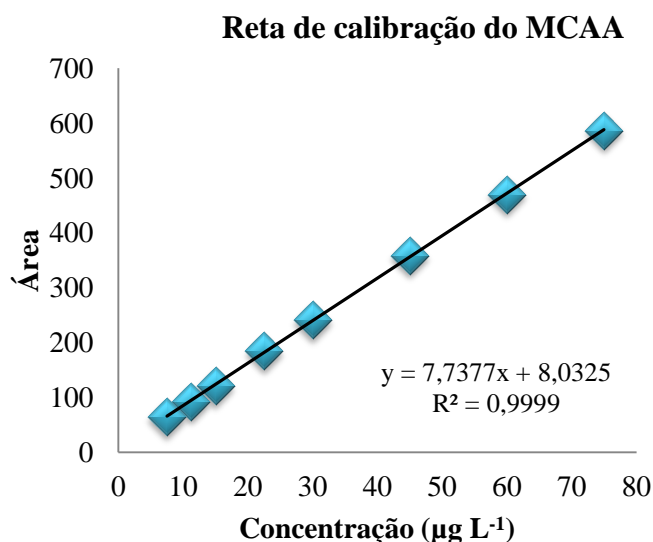
#### 6.2.3.1. Estudos de linearidade

Quando se quer validar um método cromatográfico, o primeiro passo consiste no estudo da linearidade. A realização deste estudo consiste na injeção de um conjunto de soluções padrão de diferentes concentrações, nas mesmas condições de análise.

Para determinar a gama de trabalho, foram injetadas soluções de concentração entre 5 a 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , descritas em 5.2.3.5.2.

A linearidade pode ser testada recorrendo à aplicação de vários testes estatísticos. Inicialmente é representado graficamente a dependência do sinal instrumental para cada um dos analitos em estudo em função da sua concentração, após injeção de várias soluções padrão desse composto (secção 5.2.3.6.2.). A linearidade foi obtida a parti do método dos mínimos quadrados, obtendo-se uma curva de calibração para cada um dos HAAs.

Na figura 33, encontra-se apresentada a reta da calibração e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), do MCAA.



**Figura 33** – Reta de calibração do MCAA.

Na tabela 27, estão discriminadas as equações das retas e os coeficientes de determinação obtidos, assim como a gama de trabalho para os sete HAAs, em estudo.

**Tabela 27** – Gama de trabalho, equação da reta e coeficientes de determinação para os HAAs.

Ácido Haloacético	Gama de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Número de pontos	Equação da reta	Coefficiente de Determinação ( $R^2$ )
MCAA	7,5 - 75	8	$y = 7,7377x + 8,0325$	0,9999
DCAA	5 - 60	9	$y = 51,3699x + 53,0424$	0,9999
MBAA	5 - 50	8	$y = 13,8872x - 5,5546$	0,9998
BCAA	7,5 - 75	8	$y = 31,5743x + 39,9237$	0,9999
DBAA	5 - 60	9	$y = 177,7308x + 55,1744$	0,9997
TCAA	15 - 150	8	$y = 4,5806x + 33,3968$	0,9997
BDCAA	25 - 300	9	$y = 1,4505x + 2,6791$	0,9998

Por análise da tabela é possível observar que os coeficientes de determinação obtidos para todos dos compostos é superior a 0,995 (valor de aceitação interno). A partir da reta de calibração não se garante por si só a existência de linearidade na gama de concentração testada, razão pela qual são realizados outros testes estatísticos.

Começou-se por aplicar o teste estatístico da análise de resíduos (anexo 2), onde é feita a rejeição dos pontos experimentais com desvios superiores a 15% relativamente aos pontos estimados pela reta de calibração. Foi também aplicado o teste das áreas normalizadas (anexo 3), para admitir a existência de linearidade, numa determinada gama de concentração, onde é feita a rejeição dos valores normalizados que não estiverem compreendidos entre 85 e 115 %. Foi também aplicado o teste de Rikilt (anexo 4), caso exista valores que se encontrem fora do intervalo entre 90 e 110 %, esses valores devem ser rejeitados.

Na tabela 28, encontra-se resumida a informação referente à aplicação dos testes estatísticos discutidos para avaliação da linearidade.



**Tabela 28** - Resultados dos testes estatísticos para cada um dos compostos em estudo, nos estudos de linearidade.

Ácido Haloacético	Número de pontos	Análise de Resíduos (%)	Áreas Normalizadas (85 – 115%)	Teste de Rikilt (90-110%)	Teste de Mandel (VT) < ( $F_{(1, N-3)95\%}$ )
<b>MCAA</b>	8	(-2,0 - 1,7)	(92 – 103)	(96 – 107)	3,79 < 6,61
<b>DCAA</b>	9	(-2,8 – 1,9)	(90 – 106)	(95 -111)	2,87 < 5,99
<b>MBAA</b>	8	(-7,0 – 3,2)	(99- 115)	(89 – 104)	1,52 < 6,61
<b>BCAA</b>	8	(-0,9 – 1,5)	(87 – 101)	(95 – 111)	0,12 < 6,61
<b>DBAA</b>	9	(-5,5 – 3,9)	(100 – 105)	(98 – 104)	0,14 < 6,61
<b>TCAA</b>	8	(-2,7 – 2,0)	(86 – 107)	(88 – 122)	0,28 < 6,61
<b>BDCAA</b>	9	(-1,8 – 2,3)	(92 – 107)	(97 – 107)	0,34 < 5,99

Como se pode observar na tabela 28, a gama de trabalho escolhida para todos os compostos com base nos resultados do teste estatístico da análise de resíduos e no teste das áreas normalizadas demonstra a existência de linearidade.

Os resultados para o DCAA, MBAA, BCAA e TCAA, não passam nos requisitos estabelecidos pelo teste de Rikilt. A vantagem de garantir a linearidade na gama de trabalho segundo o teste de Rikilt reside no facto de, em análise de rotina não ser necessário efetuar retas de calibração diárias, sendo apenas necessário o uso de um padrão de calibração, a partir do qual se pode determinar o fator de resposta correspondente aos HAAs. Neste sentido, sempre que seja realizada a análise dos HAAs é necessário proceder à calibração instrumental com recurso a retas de calibração.

Para verificar a existência de linearidade foi também aplicado o teste de Mandel (anexo 5), de acordo com a norma ISO 8466-1. Neste teste estatístico, os dados experimentais são utilizados para verificar se se aplica uma função de calibração linear ou uma função polinomial de 2º grau. O valor teste (VT), é calculado e comparado com o valor tabelado na distribuição  $F$  de Fischer-Snedecor. Se o valor teste for inferior ou igual ao valor tabelado, conclui-se que a função linear corresponde a um bom ajuste dos pontos experimentais. Como se pode observar na

tabela 28, esta condição foi verificada para todos os HAAs, pelo que a função linear conduz a um bom ajuste dos dados experimentais.

Nos anexos correspondentes a cada teste estatístico, encontra-se como exemplo as tabelas e gráficos dos respetivos testes para um dos HAAs (MCAA). Procedeu-se da mesma forma para os restantes compostos em estudo.

### 6.2.3.2. Cálculo dos Limiares Analíticos

Depois de se determinar a gama de trabalho e realizados vários testes estatísticos foi possível calcular o limite de deteção e o limite de quantificação para cada um dos HAAs, os quais foram determinados a partir do desvio padrão residual da reta de calibração e a partir de ensaios de repetibilidade. Na tabela 29, apresentam-se os limiares analíticos do método UPLC-ESI-MS/MS obtidos com base na reta de calibração e em condições de repetibilidade.

**Tabela 29** - Limiares analíticos do método UPLC-ESI-MS/MS obtidos com base na reta de calibração e em condições de repetibilidade.

Ácidos Haloacéticos	1º Padrão da gama de linearidade ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Reta de Calibração		Ensaio de Repetibilidade (n=10)	
		LoD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LoQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LoD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LoQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
MCAA	7,5	1,0	3,1	0,9	3,0
DCAA	5,0	0,8	2,3	0,5	1,7
MBAA	5,0	0,9	2,8	0,6	2,1
BCAA	7,5	0,9	2,7	0,5	1,6
DBAA	5,0	1,4	4,1	0,3	1,1
TCAA	15,0	3,0	9,2	2,3	7,5
BDCAA	25,0	4,5	13,7	4,0	13,4

Os valores de LoQ determinados por ambos os métodos, são inferiores à concentração do primeiro padrão da curva de calibração, o que permite concluir que a gama de linearidade se encontra bem ajustada.

A soma dos LoQ para os compostos MCAA, MBAA, DCAA, DBAA e TCAA, pelas metodologias utilizadas, curva de calibração e ensaios de repetibilidade é de 21,5 e 15,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respetivamente.

Assim verifica-se que em ambos os métodos, a soma dos valores dos LOQ para os compostos regulamentados pela US EPA é inferior a 60  $\mu\text{g L}^{-1}$ , pelo que a sensibilidade deste método de ensaio é adequada, permitindo avaliar o cumprimento de um valor limite de referência estabelecido pela US EPA.

#### **6.2.3.3. Razão MRM1/MRM2**

Uma forma de confirmar a presença de um determinado composto numa amostra é normalmente através do seu tempo de retenção no cromatograma obtido. Adicionalmente nesta tecnologia a razão do sinal obtido entre as transições MRM1 e MRM2 pode também ser utilizada para confirmar a presença de um determinado composto.

Por este motivo é importante estudar a variação da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho definida de modo a garantir a estabilidade deste critério, como se encontra descrito na tabela 30.

**Tabela 30** - Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho para cada um dos compostos em estudo.

Ácidos Haloacéticos	Gama de trabalho	Média da razão MRM1/MRM2	Coefficiente de Variação (%)
MCAA	7,5 - 75	3,0	9,1
DCAA	5,0 - 60	30,9	8,3
MBAA	5,0 - 50	1,0	2,8
BCAA	7,5 - 75	9,4	7,4
DBAA	5,0 - 60	16,3	4,8
TCAA	15 - 150	1,1	5,9
BDCAA	25 - 300	2,1	6,8

Para todos os compostos a variabilidade de razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho é inferior a 10%, o que permite a utilização deste valor como critério de confirmação da presença de um determinado composto numa amostra.

#### 6.2.3.4. Estudos de Precisão em Condições de Repetibilidade

A precisão instrumental de um método pode ser avaliada em termos de repetibilidade. Por análise da tabela 31, o método apresenta uma boa repetibilidade para os dois níveis de concentração estudados.

Para o primeiro padrão da gama de trabalho a variabilidade dos ensaios de repetibilidade é maior do que a obtida para o padrão de concentração superior. Os valores dos coeficientes de variação variam entre 4,3 % (DCAA) e 13,7 % (BDCAA) para o primeiro padrão da gama de trabalho.

**Tabela 31** - Estudos de precisão do método em condições de repetibilidade (n=10).

Ácidos Haloacéticos	Concentração Inferior		Concentração Superior	
	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	CV (%)	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	CV (%)
MCAA	7,5	7,0	75	3,2
DCAA	5,0	4,3	60	2,4
MBAA	5,0	12,3	50	3,8
BCAA	7,5	5,9	75	3,4
DBAA	5,0	6,0	60	3,1
TCAA	15	8,1	150	5,8
BDCAA	25	13,7	300	5,0

#### 6.2.3.5. Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi avaliada por injeção do primeiro e último padrão da gama de trabalho para cada composto em diferentes dias.

Por análise da tabela 32, o método apresenta uma boa precisão em condições de precisão intermédia nos dois níveis de concentração estudados.

**Tabela 32-** Estudos de precisão intermédia do método.

Ácidos Haloacéticos	Concentração Inferior		Concentração Superior	
	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	CV (%)	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	CV (%)
MCAA	7,5	5,7	75	0,9
DCAA	5	5,9	60	0,8
MBAA	5	7,1	50	1
BCAA	7,5	9	75	0,9
DBAA	5	5	60	0,8
TCAA	15	11,9	150	1,1
BDCAA	25	14,6	300	6,1

Os valores dos coeficientes de variação variam entre 5 % (DBAA) e 14,6 % (BDCAA) para o primeiro padrão da gama de trabalho.

#### **6.2.4. Estudo da Influência da Etapa de Concentração no *Turbo Vap***

Com o objetivo de baixar os limites de quantificação do método, recorreu-se a uma etapa prévia de concentração das amostras no sistema de *Turbo Vap* antes da injeção no UPLC.

De forma a avaliar as possíveis perdas associadas ao passo de concentração no *Turbo Vap*, tornou-se necessário fazer estudos prévios de otimização tais como, a temperatura do banho da água e a pressão de azoto usada para concentração da amostra.

Os estudos efetuados no *Turbo Vap* foram levados a cabo com um volume de 10 mL de amostra fortificada com uma mistura de HAAs, a qual foi concentrada até se obter, um volume final de 1 mL (fator de concentração 10x). Os extratos aquosos obtidos foram analisados por UPLC-MS/MS, tendo sido calculada a percentagem de recuperação para cada composto.

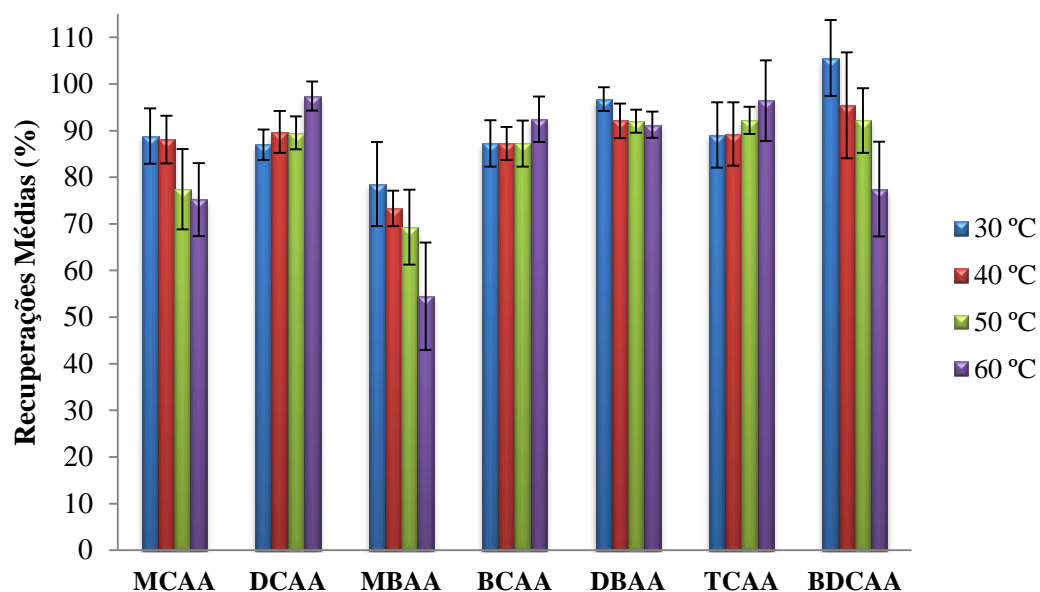
A percentagem de recuperação foi calculada com base na seguinte expressão:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_i}{C_T} \times 100 \quad (\text{Equação 31})$$

onde  $C_i$  é a concentração do composto na amostra fortificada, determinada experimentalmente e  $C_T$  é a concentração esperada do composto na amostra fortificada.

##### **6.2.4.1. Otimização da Temperatura do Banho**

Em primeiro lugar, foi otimizada a temperatura do banho do *Turbo Vap*, onde foram testadas as seguintes temperaturas: 30, 40, 50 e 60 °C. Para cada temperatura foram realizados 6 ensaios utilizando o nível de fortificação descrito na secção 5.2.3.8. Os resultados obtidos apresentam-se descritos na figura 34.



**Figura 34-** Recuperações médias obtidas para as diferentes temperaturas do banho de água do sistema de evaporação *Turbo Vap*.

Ao concentrar uma amostra de água fortificada, é necessário ter em linha de conta o fator tempo. Sendo assim, a temperatura do banho do *Turbo Vap* vai influenciar significativamente o tempo necessário para efetuar a etapa de concentração.

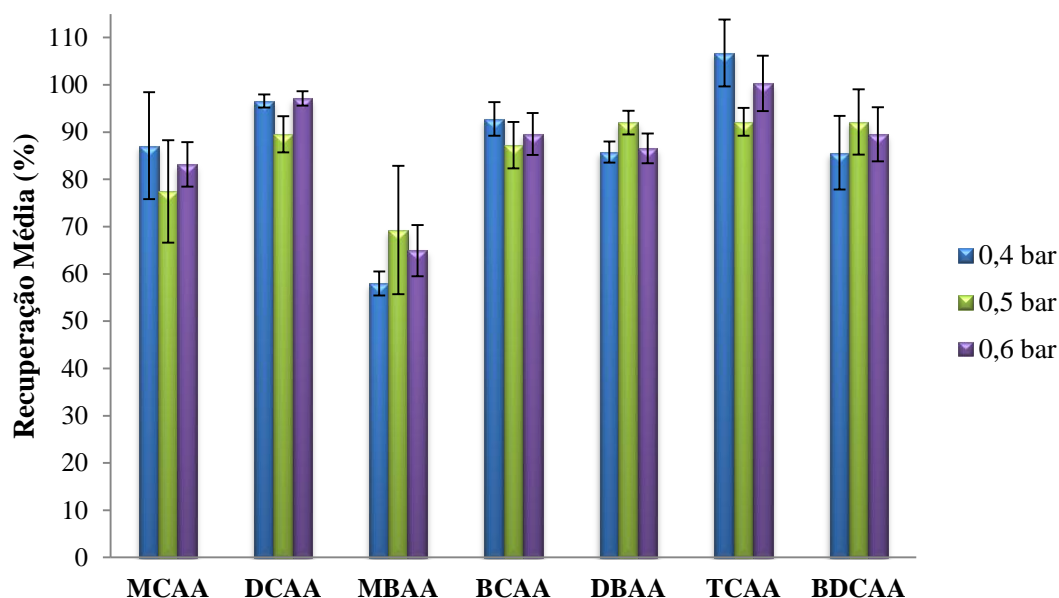
A utilização da temperatura de 30 °C apresenta percentagens de recuperação bastante boas para todos os compostos em estudo. No entanto, para ser possível a concentração de 10 mL de amostra até um volume final de 1 mL, foi necessário aproximadamente 4 horas e 30 minutos, tempo considerado excessivo, pelo que a sua utilização em rotina se torna inviável.

Comparativamente, para as temperaturas de 40 e 50 °C as percentagens de recuperação são muito semelhantes. Contudo, existe uma diferença de tempo entre as ambas de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, respectivamente, sendo favorável para a temperatura de 50 °C.

A temperatura de 60 °C apresenta percentagens de recuperação mais baixas principalmente para dois compostos (MBAA e BDCAA), comparativamente com as recuperações obtidas a uma temperatura de 50 °C. Neste sentido, foi escolhida a temperatura de 50 °C para os restantes estudos.

#### 6.2.4.2. Otimização da pressão de azoto

De seguida, foi otimizada a pressão de azoto do sistema de evaporação *Turbo Vap*, tendo sido testadas as pressões de 0,4, 0,5 e 0,6 bar. Na figura 35, encontram-se os resultados obtidos neste estudo.



**Figura 35** - Recuperações médias obtidas para as diferentes pressões de azoto no sistema de evaporação *Turbo Vap*

As percentagens de recuperação dos HAAs em estudo, não apresentam variações significativas pela variação da pressão do azoto. No entanto, em termos de variabilidade, observa-se que à pressão de 0,6 bar, os coeficientes de variação para a maioria dos compostos é menor comparativamente com as restantes pressões. Deste modo, a pressão escolhida para os restantes estudos foi de 0,6 bar.

A utilização da temperatura do banho a 50 °C e a pressão de azoto a 0,6 bar, leva a que a etapa de concentração da amostra demore aproximadamente 2 horas e 20 minutos.



#### 6.2.4.3. Ensaios de Recuperação

Depois de se ter testado quais as melhores condições de funcionamento do *Turbo Vap*, foram feitos 6 ensaios de recuperação em água ultra pura, em dois níveis de fortificação diferentes, que se encontram descritos em 5.2.3.8.

Na tabela 33, encontram-se apresentadas as recuperações obtidas e os respetivos coeficientes de variação para cada HAA, nos dois níveis de fortificação.

**Tabela 33-** Recuperações médias obtidas em 2 níveis de fortificação, em água ultra pura.

Ácidos Haloacéticos	Nível de fortificação 1		Nível de fortificação 2	
	Recuperação		Recuperação	
	Média (%) (n=6)	CV (%)	Média (%) (n=6)	CV (%)
MCAA	91	5	85	5
DCAA	99	6	95	2
MBAA	67	8	74	5
BCAA	64	11	63	5
DBAA	90	5	95	3
TCAA	102	5	105	6
BDCAA	83	6	89	5

Pelos resultados apresentados, verifica-se que não existe grande variação entre a média das recuperações para os dois níveis de fortificação, o que leva a concluir que a presença de uma maior ou menor concentração do analito numa amostra não influencia a recuperação deste no processo de concentração.

Depois de se verificar que as recuperações a diferentes níveis de fortificação são semelhantes, determinou-se o valor de recuperação média para cada composto, com base nos valores obtidos nos 6 ensaios para o primeiro e segundo nível de fortificação em água ultra pura.

Na tabela 34, encontra-se a recuperação média e o seu respetivo coeficiente de variação, bem como os limites de quantificação do método global, em água ultra pura.

**Tabela 34** – Recuperação média e limites de quantificação do método para cada HAA, em água ultra pura.

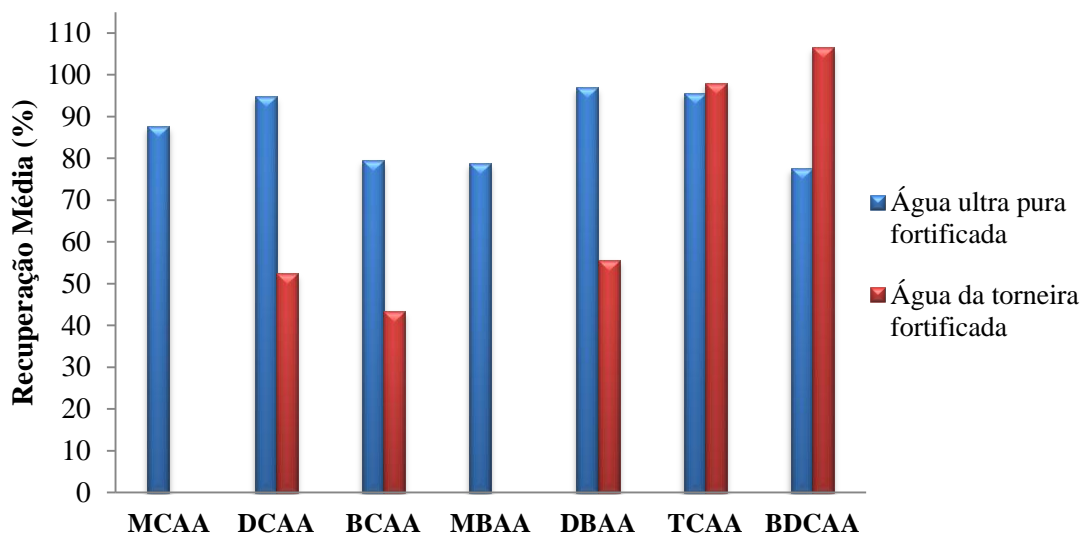
Ácidos Haloacéticos	1º Padrão da gama de linearidade ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação Média (%)	CV (%)	LoQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
MCAA	7,5	87,6	6,0	0,9
DCAA	5,0	96,7	5,1	0,5
MBAA	5	71,7	9,7	0,7
BCAA	7,5	62,3	8,6	1,2
DBAA	5	92,4	4,9	0,5
TCAA	15	103,2	5,4	1,5
BDCAA	25	86,0	6,2	2,9

## 6.2.5. Efeito da Matriz

### 6.2.5.1. Etapa de Concentração da Amostra

Depois da otimização da etapa de concentração estar concluída, procedeu-se ao estudo do efeito da matriz através de ensaios de recuperação. Neste estudo, foram realizados 6 ensaios com água da torneira fortificada e 6 ensaios com água ultra pura fortificada com uma mistura de HAA, descritos em 5.2.3.9. Em paralelo fizeram-se 6 ensaios em branco, com água da torneira e com água ultra pura. A realização de ensaios em branco com água da torneira tem como objetivo detetar a presença de eventuais HAAs nas amostras de modo a corrigir os resultados obtidos com as amostras de água fortificada. Estas amostras foram sujeitas ao processo de concentração em *Turbo Vap* antes de serem analisadas por UPLC-ESI-MS/MS.

Na figura 36, encontram-se as percentagens de recuperação média para todos os HAAs em estudos em água ultra pura e água da torneira fortificada depois da etapa de concentração no *Turbo Vap*.



**Figura 36** – Recuperação média do efeito de matriz em água ultra pura e água da torneira fortificada depois da etapa de concentração no *Turbo Vap*.

Como se pode observar pela figura, a percentagem de recuperação média dos HAAs em água da torneira é muito diferente da obtida em água ultra pura, verificando-se uma diminuição da percentagem de recuperação média, de um modo geral, para a água da torneira fortificada. Este efeito, pode ser causado por perdas durante a etapa de concentração ou devido ao fenómeno de supressão iónica no espectrómetro de massa. No caso do MCAA e MBAA, a recuperação em água da torneira foi nula, verificando-se um efeito de matriz de 100 %. Chen e a sua equipa de colaboradores, referem que o MCAA e o MBAA são compostos que apresentam supressão iónica em água da torneira concentrada (5).

O peso molecular dos compostos e a sua polaridade é um fator importante no processo de supressão, uma vez que foi demonstrado que os compostos com peso molecular mais baixo e os compostos mais polares são suscetíveis a este fenómeno (87). Depois da etapa de concentração, as moléculas menos polares presentes na matriz estarão presentes numa elevada concentração no extrato, pelo que irão impossibilitar que as moléculas mais polares como os HAAs estejam acessíveis ao processo de ionização por *electrospray* espectrómetro de massa, causando assim o fenómeno de supressão iónica.

Após ter sido verificado que a concentração no *TurboVap* de 10 mL de água da torneira fortificada com HAAs, conduzia a um efeito de matriz bastante pronunciado para a maioria dos compostos, decidiu-se abandonar esta etapa de concentração da amostra.

#### 6.2.5.2. Análise Direta das Amostras

Com base nos resultados apresentados relativamente ao efeito de matriz em amostras concentradas, procedeu-se à injeção direta das amostras, por forma a verificar se existe efeito de matriz.

Neste estudo foram efetuados 6 ensaios em água da torneira em 3 níveis de fortificação e 6 ensaios em água da torneira (branco), como indicado em 5.2.3.9.

Na tabela 35, encontra-se a percentagem de recuperação obtida para cada HAA nos diferentes níveis de fortificação e respetivos coeficientes de variação por injeção direta no instrumento analítico.

**Tabela 35** - Recuperações médias de HAAs em 3 níveis de fortificação na água da torneira.

Ácidos Haloacéticos	Nível de fortificação 1		Nível de fortificação 2		Nível de fortificação 3	
	Recuperação	CV	Recuperação	CV	Recuperação	CV
	Média		Média		Média	
(%)						
MCAA	-	-	73	9	62	4
DCAA	85	7	92	4	94	2
MBAA	85	6	88	7	80	3
BCAA	80	17	79	8	88	4
DBAA	84	11	93	4	93	2
TCAA	102	7	115	5	101	7
BDCAA	92	7	116	4	112	3

Como se pode observar, no caso do MCAA, ao nível de fortificação 1, mesmo a partir da injeção direta das amostras foi verificada a presença de supressão iónica

elevada. Neste sentido, só é possível quantificar o composto a partir da concentração de 15 µg/L.

Neste sentido, para uma injeção direta da amostra, os níveis de supressão iónica, que ocorrem para os HAAs à concentração mais baixa da gama de trabalho, estão apresentados na tabela 36.

**Tabela 36** - Supressão iónica para os diferentes HAAs em água da torneira fortificada por injeção direta.

Ácidos Haloacéticos	Concentração (µg L <sup>-1</sup> )	Supressão Iónica (%)
MCAA	15	33
DCAA	5	9
MBAA	5	16
BCAA	7,5	18
DBAA	5	10
TCAA	15	-6
BDCAA	25	-7

Como podemos observar o MCAA, mesmo com injeção direta continua a ser o composto que apresenta uma maior percentagem de supressão iónica. Esta constatação pode estar relacionada com o facto de este composto ser o primeiro composto a eluir da coluna cromatográfica e também por ser o que apresenta a menor massa molecular.

De acordo com a literatura (5), os compostos que eluem mais rapidamente da coluna cromatográfica são os que são mais influenciados pelos compostos mais apolares presentes na matriz a analisar, dado que estes eluem também com baixos tempos de retenção cromatográfica, causando, assim, o efeito de supressão iónica.

As recuperações médias utilizadas para a análise de amostras em rotina estão indicadas na tabela 37, onde o MCAA, por motivos de supressão iónica nas amostras só poderá ser quantificado a partir do terceiro padrão da gama de trabalho, inicialmente prevista.

Com os valores das recuperações foi possível calcular o limite de quantificação do método, a partir das concentrações mais baixas da gama de linearidade, os quais se encontram descritos na tabela 37.

**Tabela 37** – Recuperações médias e limites de quantificação global do método.

Ácidos Haloacéticos	1º Padrão da gama de linearidade ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperações Médias (%)	Limite de quantificação global do método ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
MCAA	15	67	22
DCAA	5	91	5
MBAA	5	84	6
BCAA	7,5	82	9
DBAA	5	90	6
TCAA	15	106	14
BDCAA	25	107	23

A soma dos limites de quantificação dos 5 HAAs regulamentados pela EPA é inferior a  $60 \mu\text{g/L}$  ( $54 \mu\text{g L}^{-1}$ ), pelo que podemos concluir que o método desenvolvido é apropriado para a análise dos HAAs na água de consumo.

#### 6.2.6. Análise de Amostras

Neste trabalho analisaram-se algumas amostras de diversas zonas do sistema de abastecimento da EPAL: adutores, reservatórios, em vários pontos de colheita da rede de distribuição e em amostras de água da torneira. As amostras da rede de distribuição encontram-se referenciadas como pontos 1, 2 e 3. Os resultados obtidos pela análise das várias amostras por UPLC-ESI-MS/MS encontram-se na tabela 38.

**Tabela 38** – Análise de HAAs em várias amostras por ULPC-ESI-MS/MS.

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						
	MCAA	DCAA	MBAA	BCAA	DBAA	TCAA	BDCAA
Saída da ETA 1	< 22	<b>35,6</b>	< 6	<b>10,4</b>	< 6	<b>41,6</b>	< 23
Saída da ETA 2	< 22	<b>11,8</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Saída da ETA 3	< 22	<b>11,7</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Saída da ETA 4	< 22	<b>41,5</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Saída da ETA 5	< 22	<b>10,7</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Reservatório 1	< 22	<b>7,9</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Reservatório 2	< 22	<b>11,1</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Reservatório 3	< 22	<b>11,5</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Reservatório 4	< 22	<b>10,5</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Reservatório 5	< 22	< 5	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Reservatório 6	< 22	<b>7,7</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Reservatório 7	< 22	< 5	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Adutor	< 22	< 5	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Ponto 1	< 22	<b>10,2</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Ponto 2	< 22	<b>9,1</b>	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Ponto 3	< 22	< 5	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Água da torneira 1	< 22	< 5	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Água da torneira 2	< 22	< 5	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23
Água da torneira 3	< 22	< 5	< 6	< 9	< 6	< 14	< 23

Os resultados obtidos com estas amostras permitem tirar algumas conclusões em relação à existência dos HAAs na água de consumo tal como em relação à predominância de uns face a outros. Em relação a todas as amostras analisadas apenas foi observado a presença do DCAA, BCAA e do TCAA acima do limite de quantificação do método de ensaio. Em todas as amostras analisadas os restantes compostos apresentaram valores inferiores aos limites de quantificação estabelecidos neste método de ensaio.

As amostras colhidas à saída das ETAs são as que apresentam maior quantidade de HAAs, nas quais os HAAs que se encontra em maior quantidade são o TCAA e o DCAA.

O DCAA é o composto que apresenta maior predominância nas amostras de águas de consumo analisadas neste trabalho. Existem determinados fatores como já foi referido que podem influenciar a formação dos DBPs, pelo que a análise posterior de outras amostras podem levar à obtenção de resultados diferentes.

A análise efetuada à água da torneira mostra que os HAAs apresentam valores inferiores aos limites de quantificação estabelecidos neste método de ensaio.

Apenas para a amostra da saída da ETA 1 se verificou que a soma dos compostos regulamentados pela US EPA é superior ao valor limite estabelecido ( $60 \mu\text{g L}^{-1}$ ), apresentado nesta amostra uma concentração de  $77,2 \mu\text{g L}^{-1}$  para a soma da concentração do DCAA e TCAA.

Não existe ainda valores limites para estes compostos na legislação europeia e nacional referente à água de consumo.

#### **6.2.7.Cálculo de Incertezas do Método**

O cálculo da incerteza global associada ao método de ensaio é efetuado tendo em conta as diversas fontes de incertezas provenientes das várias etapas de validação do método. Após a conclusão da validação do método, determinou-se a incerteza associada ao método global UPLC-ESI-MS/MS usando duas abordagens distintas (anexo 6).

Na primeira abordagem para a estimativa da incerteza do método de ensaio usou-se a componente da incerteza associada à preparação dos padrões de calibração ( $u_{\text{padrão}}$ ), a componente da incerteza associada à interpolação da reta de calibração ( $u_{\text{reta}}$ ), e a componente da incerteza associada à precisão intermédia do método ( $u_{\text{prec}}$ ).

Na segunda abordagem para a estimativa da incerteza do método de ensaio usou-se, a componente de incerteza associada à precisão intermédia do método ( $u_{\text{prec}}$ ), e a componente da exatidão do método (ensaio de recuperação) ( $u_{\text{ext}}$ ).

Na tabela 39, encontram-se apresentados os resultados obtidos para a incerteza expandida ( $U$ ) usando a primeira abordagem.



**Tabela 39** - Incerteza expandida do método para cada HAA obtida pela primeira abordagem.

Ácidos Haloacéticos	$u_{reta}$ (%)	$u_{padrão}$ (%)	$u_{prec}$ (%)	$U$ (%)
MCAA	4,8	2,7	5,2	<b>15,1</b>
DCAA	5,2	0,1	1,9	<b>11,2</b>
MBAA	6,4	1,3	2,9	<b>14,3</b>
BCAA	4,1	1,3	4,2	<b>12,0</b>
DBAA	9,2	1,3	0,7	<b>18,7</b>
TCAA	7,2	1,3	3	<b>15,8</b>
BDCAA	5,9	0,1	3,4	<b>13,7</b>

Como podemos observar a partir da tabela 39, de um modo geral as incertezas globais do método podem se considerar bastantes aceitáveis. O HAA que apresenta maior valor de incerteza expandida (18,7%), é o DBAA. A componente que apresenta maior contribuição para o resultado obtido é a incerteza associada à interpolação da reta de calibração.

De todos os fatores que contribuem para a incerteza expandida para este modelo, a incerteza associada à interpolação da reta de calibração é a que mais contribui para a maioria dos compostos exceto o MCAA e o BCAA. Para estes compostos, a componente da precisão apresenta uma maior contribuição para o cálculo da incerteza expandida. Este resultado, pode ser justificado pelo facto de estes dois compostos apresentarem uma maior percentagem de supressão iónica nas matrizes estudadas afectando assim a precisão do método.

Com base nas percentagens obtidas da componente da incerteza associada à preparação de padrões pode-se dizer que o valor é desprezável, uma vez que, o valor apresentado para a maioria dos compostos é menor que 1/5 do valor da componente da incerteza associada à interpolação na reta de calibração, critério para se considerar um componente como desprezável (anexo 6).

Os resultados obtidos para a certeza expandida ( $U$ ), usando a segunda abordagem estão apresentados na tabela 40.

**Tabela 40** - Incerteza expandida do método para cada HAA obtida pela segunda abordagem.

Ácidos Haloacéticos	$u_{prec}$ (%)	$u_{ext}$ (%)	$U$ (%)
MCAA	5,4	6,2	<b>16,4</b>
DCAA	1,9	3,6	<b>8,2</b>
MBAA	3,2	5,1	<b>12</b>
BCAA	4,4	6,0	<b>14,9</b>
DBAA	1,5	1,3	<b>4</b>
TCAA	3,3	3,4	<b>9,4</b>
BDCAA	3,4	3,8	<b>10,2</b>

A incerteza global do método de ensaio apresenta um valor superior quando se entra com a contribuição da extrapolação da reta de calibração, comparativamente com a exatidão do método.

Com base nos valores obtidos para a incerteza do método de ensaio pela segunda abordagem para cada HAA os limites de quantificação do método deveram ser expressos da seguinte formo, como podemos observar na figura 41.

**tabela 41** – Limites de quantificação do método expressos com base nas incertezas.

Ácidos Haloacéticos	Limite de quantificação global do método ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
MCAA	22
DCAA	5,0
MBAA	6,0
BCAA	9
DBAA	6,0
TCAA	14
BDCAA	23

## Capítulo 7 – Conclusões e Perspetivas Futuras

Os estudos realizados permitiram concluir que a metodologia analítica SPME-GC/ITMS não é adequada para análise de HAAs, uma vez que a utilização da microextração em fase sólida como método de extração dos compostos alvo não apresentava valores aceitáveis de precisão.

A optimização das condições do sistema UPLC-ESI-MS/MS permitiu desenvolver um método selectivo, com uma boa sensibilidade em que todos os compostos em estudo são analisados em 9 minutos.

Os estudos de validação realizados permitiram obter gamas de trabalho lineares, entre  $5\text{-}50\ \mu\text{g L}^{-1}$  e  $25\text{-}300\ \mu\text{g L}^{-1}$  para o MBAA e o BDCAA respectivamente, com bons coeficientes de determinação ( $R^2 \geq 0,9997$ ).

O método apresenta uma boa repetibilidade, com coeficientes de variação inferiores a 15 % para todos os HAAs. Em termos de precisão intermédia, os coeficientes de variação são também inferiores a 15 %.

A razão MRM1/MRM2 mostrou ser estável ao longo da gama de trabalho para todos os compostos, podendo ser utilizada como critério de identificação dos compostos, juntamente com o tempo de retenção dos mesmos.

A estimativa de incertezas do método de ensaio é bastante aceitável para todos os HAAs, apresentando valores inferiores a 19 % para todos os compostos.

Os estudos de efeito de matriz permitiram concluir que a utilização de um passo de concentração da amostra não é um procedimento adequado uma vez que se verificou a existência de efeitos de supressão iónica, entre 2 e 100 % para o TCAA e MCAA, respectivamente, derivados da utilização do *electrospray* como técnica de ionização dos compostos em estudo. Desta forma, optou-se pela não utilização de um método de preparação da amostra, realizando-se a injeção directa das amostras no UPLC-MS/MS. Esta metodologia permite uma redução acentuada da supressão iónica para a maioria dos compostos, conseguindo-se em simultâneo atingir limites de quantificação global do método entre 5 e 23  $\mu\text{g/L}$  para o DCAA e BDCAA, respectivamente.

A aplicabilidade do método foi testada em amostras reais de água para consumo humano, recolhidas em deferentes pontos ao longo do sistema de

abastecimento da EPAL. A maioria dos compostos encontra-se em níveis inferiores aos limites de quantificação do método em todas as amostras, com exceção do DCAA, BCAA e TCAA. Em todas as amostras de água da torneira, os HAAs apresentaram concentrações inferiores aos limites de quantificação estabelecidos neste método de ensaio.

Em suma, a optimização e validação do método UPLC-ESI-MS/MS permitiu o desenvolvimento de um método linear, preciso e com limiares analíticos que permitem atingir o limite imposto pela US EPA, em que a soma do MCAA, MBAA, DCAA, DBAA e TCAA apresentam um valor de  $54 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo este inferior aos  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  estabelecido pela US EPA. Desta forma, os estudos realizados permitem a análise dos 7 HAAs por UPLC-ESI-MS/MS, podendo esta metodologia analítica ser implementada em rotina no Laboratório Central da EPAL em substituição do método atualmente utilizado, LLE-GC/ECD. Como estudos futuros a efetuar nesta área sugere-se a tentativa de implementação e validação do método de ensaio para a análise do CDBAA e TBAA; sugere-se ainda o estudo da estabilidade das amostras cloradas em termos da concentração de HAAs desde a colheita até ao tempo máximo de análise de armazenamento das amostras no laboratório para posterior análise.

## Capítulo 8 – Referências Bibliográficas

1. [www.inag.pt/snrh](http://www.inag.pt/snrh) (consultado 12-08-2012).
2. Zilberman I. Introdução à Engenharia Ambiental. 1ª Edição: Editora da Ulbra; 1997.
3. Ashbolt N. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*. 2004;198:229-38.
4. Organização Mundial de Saúde (WHO). Guidelines for Drinking - Water Quality Fourth Edition 2011.
5. Chen C, Chang S, Wang G. Determination of Ten Haloacetic Acids in Drinking Water Using High- Performance and Ultra-Performance Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*. 2009;47:67-74.
6. Meng L, Wu S, Ma F, Jia A, Hu J. Trace determination of nine haloacetic acids in drinking water by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217:4873-6.
7. EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres SA. Qualidade da Água para Consumo Humano. Relatório Anual 2009.
8. <http://www.epal.pt> (Consultado 17-08-2012).
9. Almeida C. Especificação Orgânica em Águas para Consumo Humano: Fenol, Benzeno e Compostos Derivados. Faculdade de Farmácia de Lisboa: Universidade de Lisboa; 2001.
10. Instituto da Água (INAG). A Água - Da Origem ao Consumidor. Lisboa; 2002.
11. Gray N. Drinking Water Quality - Problems and Solutions: John Wiley & Sons; 1994.
12. Lopes A. Validação do método de ensaio para análise de ácidos haloacéticos por LLE-GC-ECD após reacção de derivatização. Relatório de Estágio em Química Tecnológica: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2006.
13. Gaur R. Basic Environmental Engineering: New Age International, (P) Limited, Publishers; 2008.
14. McEwen J. Treatment Process Selection for Particle Removal: West Quincy Ave; 1997.
15. Rodrigo C, Lopes J. Controlo Operacional em Sistemas Públicos de Abastecimento de Água: Instituto Regulador de Águas e Resíduos; 2007.
16. Simões N. Fenol e Clorofenóis em Águas para Consumo Humano:Optimização do Método de Análise por SPME-GC/MS: Universidade de Lisboa; 2004.

17. United States Environmental Protection Agency (EPA). Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual. 1999.
18. Boorman G, Dellarco V, Dunnick J. Drinking Water Disinfection Byproducts: Review and Approach to Toxicity Evaluation. *Environmental Health Perspectives*. 1999;107:207-17.
19. Penetra A, Cardoso V. Subprodutos de desinfecção da água para consumo Humano: Monitorização no sistema de abastecimento de água da EPAL. 2011.
20. IRAR. Desinfecção da água destinada ao consumo Humano. 2007.
21. Deborde M, Gunten U. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment - Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Research*. 2008;42:13-51.
22. Pals J, Ang J, Wagner E, Plewa M. Biological Mechanism for the Toxicity of Haloacetic Acid Drinking Water Disinfection Byproducts. *Environmental Science Technology*. 2011;45:5791-7.
23. Richardson S. Drinking water disinfection by-products in *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*. John Wiley & Sons, Inc.; 1998.
24. Paull B, Barron L. Using ion chromatography to monitor haloacetic acids in drinking water: a review of current technologies. *Journal of Chromatography A*. 2004;1046:1-9.
25. Dalvi A, Al-Rasheed R, Javeed M. Haloacetic acids (HAAs) formation in desalination processes from disinfectants. *Desalination*. 2000;129:261-71.
26. Rodriguez M, Sérodes J, Levallois P. Behavior of trihalomethanes and haloacetic acids in a drinking water distribution system. *Water Research*. 2004;38:4367-82.
27. Nikolaou A, Kostopoulou M, Lekkas T. Organic by-products of drinking water chlorination. *Global Nest: the Int J*. 1999;3:143-50.
28. Rodrigues P, Silva J, Antunes M. Factorial analysis of the trihalomethanes formation in water disinfection using chlorine. *Analytica Chimica Acta*. 2006;595:266-74.
29. Panyapinyopola B, Marhabab T, Kanokkantaponga V. Characterization of precursors to trihalomethanes formation in Bangkok source water. *Journal of Hazardous Materials*. 2005;120:229-36.
30. Kanokkantapong V, Marhaba T, Pavasant P, Panyapinyophol B. Characterization of haloacetic acid precursors in source water. *Journal of Environmental Management*. 2006;80:214-21.
31. Westerhoffa P, Chaob P, Mash H. Reactivity of natural organic matter with aqueous chlorine and bromine. *Water Research*. 2004;38 (1502-1513).
32. Solomons G, Fryhle C. *Organic Chemistry* ninth edition: Wiley; 2008.
33. Calderon R. The epidemiology of chemical contaminants of drinking water. *Food and Chemical Toxicology*. 2000;38:S13 - S20.

34. Golfinopoulos S, Nikolaou A. Survey of disinfection by-products in drinking water in Athens, Greece. *Desalination*. 2005;176:13 - 24.
35. Hamidina N., Q.J. Y. Human health risk assessment of chlorinated disinfection by-products in drinking water using a probabilistic approach. *Water Research*. 2008;42:3263 - 74.
36. Cardador M, Gallego M. Determination of haloacetic acids in human urine by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2010;878:1824-30.
37. Health Canada. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document Haloacetic Acids: Authority of the Minister of Health; 2008.
38. Daniel F, DeAngelo A, Stober J. Hepatocarcinogenicity of Chloral Hydrate, 2-Chloroacetaldehyde and Dichloroacetic Acid in the Male E36C3F<sub>1</sub> Mouse. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1992;19:159-68.
39. Moser V, Phillips P, Levine A. Neurotoxicity Produced by Dibromoacetic Acid in Drinking Water of Rats. *Toxicological Sciences* 2004;79:112-22.
40. DeAngelo A, Daniel F, Stober J. The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male B6C3F<sub>1</sub> mouse. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1991;16:337-47.
41. DeAngelo A, Daniel F. The carcinogenicity of dichloroacetic acid in male Fischer 344 rat. *Toxicology*. 1996;114:207-21.
42. Hinckley A, Bachand A, Reif J. Late Pregnancy Exposures to Disinfection By-products and Growth-Related Birth Outcomes. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113:1808-13.
43. Cardador M, Serrano A, Gallego M. Simultaneous liquid-liquid microextraction/methylation for the determination of haloacetic acids in drinking waters by headspace gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2008;1209:61-9.
44. Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto.
45. Decreto-Lei 103/2010 de 24 de Setembro
46. Decreto-Lei 243/01 de 5 de Setembro.
47. Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto.
48. Sarrion M, Santos F, Galceran M. In situ derivatization/solid-phase microextraction for the determination of haloacetic acids in water. *Anal Chem*. 2000;72:4865-73.
49. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/disinfectionbyproducts.cfm> (Consultado a 17-09-2012).
50. Method 552.3. Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid microextraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection. Technical Support Center Office of Ground Water and Drinking Water U.S Environmental Protection Agency. 2003.

51. Method 552. Determination of haloacetic acids in drinking water by liquid liquid extraction, derivatization, and gas chromatography with electron capture detection. Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency; 1990.
52. Method 552.2. Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection. National Exposure Research Laboratory Office of research and Development U.S Environmental Protection Agency.
53. Waseem S, Abdullah P. SPE-GC-MS for the determination of halogenated acetic acids in drinking water. *Chromatographia*. 2009.
54. Loos R, Barceló D. Determination of haloacetic acids in aqueous environments by solid-phase extraction followed ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2001;938:45-55.
55. Alpendurada M. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000;889:3-14.
56. Pires A, Augusto F. Microextração por Fase Sólida. *Química Nova*. 1999;23:523-30.
57. Almeida C, Rosário P, Seródio P, Nogueira J. Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. *Química Nova*. 2004;95:69-77.
58. Pawliszyn J. Applications of Solid Phase Microextraction: RSC Chromatography Monographs; 1999.
59. Lord H, Pawliszyn J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*. 2000;885:153-93.
60. Mester Z, Sturgeon R. Trace element speciation using solid phase microextraction. *Spectrochimica Acta B*. 2005;60:1243-69.
61. Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction Theory and Practice: Wiley-VCH; 1997.
62. Nogueira J, Mikhail S, Tswett: Um legado para a cromatografia moderna. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*. 2006;nº 100.
63. Ettre L. Chromatography: The separation technique of the 20th century. *Chromatographia*. 2000;51:7-17.
64. Neves H, Freitas A. Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução: Dias de Sousa, Lda; 1996.
65. McNair M, Miller J. Basic Gas Chromatography. Second Edition: John Wiley & Sons, Inc; 2009.
66. Skoog D, Holler F, Crouch S. Principles of Instrumental Analysis. 6ª ed: Thomson Brooks/Cole; 2007.
67. Miller J. Chromatography: Concepts and Contrasts. 2ª ed: John Wiley and Sons; 2005.



68. Cazes J. Encyclopedia of Chromatography: Copyrighted Material; 2004.
69. <http://nl.wikipedia.org/wiki/Split/splitless-injector> (consultado a 19-09-2012).
70. de Hoffman E, Stroobant V. Mass Spectrometry - Principles and Applications: Wiley; 2007.
71. Smith R. Understanding Mass Spectra: a basic approach. 2ª ed: John Wiley and Sons; 2004.
72. Smith R. Understanding Mass Spectra: A basic Approach. Second edition John Wiley and Sons; 2005.
73. Maldaner L, Jardim I. O estado de arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. Química Nova. 2009;32:214-22.
74. Srivastava B, Sharma B, Baghel U, Sethi N. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): A Chromatography Technique. International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance. 2010;2:19-25.
75. Swartz M. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. Separation Science Redefined. 2005:8-14.
76. Gabelica V, De Pauw E. Internal energy and Fragmentation of ions produced in electrospray sources. Mass Spectrometry Reviews. 2005;24:566-87.
77. Kostianen R, Kauppila T. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 2009;1216:685-99.
78. Dole M, Mack L, Hinea R, Mobley R, Ferguson L, Aline M. Molecular beam of macroions. Journal of Chemistry and Physics. 1968;49:2240-9.
79. Irinarte J, Thomson B. On the evaporation of charged ions from small droplets. Journal of Chemistry and Physics. 1976;64:2287-94.
80. Gaffney V. Monitorização de fármacos na água bruta e na água para consumo Humano por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa *tandem*. Faculdade de Farmácia: Universidade de Lisboa; 2011.
81. Crotti A, Lopes R. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de iões de substâncias de baixo peso molecular. Química Nova. 2006;29:287-92.
82. Particle Sciences. Mass Spectrometry in Bioanalysis. Technical Brief. 2009.
83. <http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=17&numero=3> (Consultado a 28-09-2012).
84. Decisão 2002/657/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, 12 de Agosto, relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados, Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L221/8. 2002.
85. Document, nº SANCO/12495. Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed. 2011.

86. Rath J, Reyes F. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*. 2008;31:1190 - 8.
87. Trufelli H, Palma P, Famiglini G, Cappiello A. An overview of matrix affects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2010;30:1-19.
88. Authority APaVM. Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultura and veterinary chemical products. 2004.
89. McPolin O. Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis: MST; 2009.
90. Ribani M, Bottoli C, Collins C, Jardim I, Melo L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. 2004;27:771-80.
91. International Organization for Standardization. Water Quality - calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: statistical evaluation of the linear calibration function: ISO 8466-1. Geneva; 1990.
92. Sá C, Boaventura R, Pereira I. Analysis of haloacetic acids in water and air (aerosols) from indoor swimming pools using HS-SPME/GC/EDC. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2012;47:176-83.
93. Yee-Chung M, Chi-Yung C. Evaluation of the effects of various gas chromatographic parameters on haloacetic acids disinfection by-products analysis. *Journal of Chromatography A*. 2005;1076:216-9.
94. Zhang X, Minear R. Decomposition of trihaloacetic acids and formation of the corresponding trihalomethanes in drinking water. *Water Research* 2002;36:3665-73.
95. Lifongo L, Browden D, Brimblecombe P. Thermal degradation of haloacetic acids in water. *International Journal of the Physical Sciences*. 2010;5:738-47.
96. Almeida C, Bronze M. Validação de Metodologias Analíticas. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2005.
97. van Trijp J, Roos A. RIKILT-DLO, Model for the calculation of calibration curves, RIKILT report 91.02. Wageningen, The Netherlands. 1991.
98. International Organization for Standardization ISO. Water Quality-calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristic. Part. 2: statistical evaluation of the non-linear calibration function. ISO 8466-2. Geneva; 1990.
99. EUROCHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Reasurement. Second Edition. 2000.
100. Magnusson B, Naykki T, Hovind H, Krysell M. Nordtest Report- Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. 2003.

## Anexos

### Anexo 1 – Método dos mínimos quadrados

A forma algébrica da equação de uma reta é dada pela equação 32 (91):

$$y = a + bx \quad (\text{Equação 32})$$

Onde:

- a- Ordenada na origem
- b- Declive da reta

Esta reta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes,  $(x_1, y_1); \dots; (x_n, y_n)$  onde  $N$  é o número de pontos da reta. A média dos valores de  $x$  (concentração dos padrões utilizados) representa-se por  $\bar{x}$  e a média dos valores de  $y$  (sinal instrumental) representa-se por  $\bar{y}$ , e a posição  $(\bar{x}, \bar{y})$  é designada por centróide.

O cálculo do coeficiente de correlação,  $R$ , pode ser usado como um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica:

$$R = \frac{\sum_i \left\{ \left( x_i - \bar{x} \right) \left( y_i - \bar{y} \right) \right\}}{\sqrt{\left[ \left\{ \sum_i \left( x_i - \bar{x} \right)^2 \right\} \left\{ \sum_i \left( y_i - \bar{y} \right)^2 \right\} \right]}} \quad (\text{Equação 33})$$

As curvas de calibração devem apresentar valores de coeficiente de correlação superiores a 0,995, no entanto quanto mais próximo do valor de 1 (correlação positiva) ou de -1 (correlação negativa) estiver este coeficiente maior será a qualidade dos resultados.

Para o cálculo do coeficiente de correlação é necessário ter em conta algumas precauções para que não se cometam erros de interpretação, pois um bom coeficiente

correlação não é sinónimo da existência de uma relação linear. Assume-se ainda que todos os erros associados aos valores de  $x$  são desprezáveis face aos valores dos  $y$ .

O coeficiente de determinação da reta ( $R^2$ ) é dado pelo quadrado do coeficiente de correlação. Neste método demonstra-se que os coeficientes  $a$  e  $b$  da reta de regressão de  $y$  em  $x$ , são dados pela equação 34 e 35:

$$R = \frac{\sum_i \left\{ \left( x_i - \bar{x} \right) \left( y_i - \bar{y} \right) \right\}}{\sqrt{\left[ \left\{ \sum_i \left( x_i - \bar{x} \right)^2 \right\} \left\{ \sum_i \left( y_i - \bar{y} \right)^2 \right\} \right]}} \quad (\text{Equação 34})$$

$$a = \bar{y} - b \bar{x} \quad (\text{Equação 35})$$

onde:

$x$  – Valores individuais de concentração conhecida na solução padrão

$y$  – Valores individuais do sinal instrumental

$\bar{x}$  – Média dos valores  $x$  (concentração dos padrões utilizados)

$\bar{y}$  – Média dos valores de  $y$  (sinal instrumental)

Os coeficientes  $a$  e  $b$  dão uma estimativa verdadeira da função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ( $s_{y/x}$ ) da reta de regressão 36:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i)]^2}{N - 2}} \quad (\text{Equação 36})$$

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal em torno da curva de calibração. Os desvios padrão de declive,  $S_b$ , e da ordenada da origem,  $S_a$ , são dados pelas equações 37 e 38, respetivamente:

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

(Equação 37)

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

(Equação 38)

e podem ser usados para calcular os limites de confiança de  $a$  e  $b$  :

$$b \pm ts_b \quad a \pm ts_a$$

sendo  $t$  o valor da variável de *Student* para o nível de confiança desejado de (n-2) graus de liberdade.

### Cálculo da concentração

Após ter determinado o declive e a ordenada na origem de uma reta de regressão, pode-se calcular o valor de  $x$  correspondente a um valor médio de  $y$ . A concentração de uma amostra por interpolação da curva de calibração é calculada pela equação 39:

$$x_i = \frac{y_i - a}{b}$$

(Equação 39)

### Desvio Padrão do Método ( $S_m$ )

Este parâmetro é um dos que permite ao analista verificar a qualidade do seu trabalho:

$$s_m = \frac{s_{y/x}}{b}$$

(Equação 40)

### **Coefficiente de Variação do Método ( $CV_m$ )**

Este parâmetro permite comparar diferentes calibrações e métodos analíticos e é expresso pela equação 41 (em %):

$$CV_m = \frac{s_m}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{(Equação 41)}$$

## Anexo 2 – Análise de Resíduos

Um bom indicador da linearidade é a determinação dos resíduos, a qual se baseia na avaliação da distância entre os valores de  $y$  experimentais e os valores  $y'$  ideais da reta de calibração. Uma representação gráfica destes valores em função das concentrações deve dar origem a um conjunto de pontos que se dispõem aleatoriamente em torno do eixo dos  $xx$ . Caso contrário poderá ser indicativo de que a função que melhor se ajusta ao conjunto de pontos experimentais poderá ser uma curva e não uma reta.

Para admitir a existência de linearidade numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores deviam ter um desvio igual ou inferior a 15%, ou seja, estar compreendidos entre 85 e 115%. Sempre que existirem resíduos que apresentem um desvio superior a 15% devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos.

Calcula-se a área estimada ( $y'$ ) com base na equação da reta obtida para o composto em questão:

$$y' = a + bx \quad \text{(Equação 42)}$$

Onde:

$a$  – Ordenada na origem

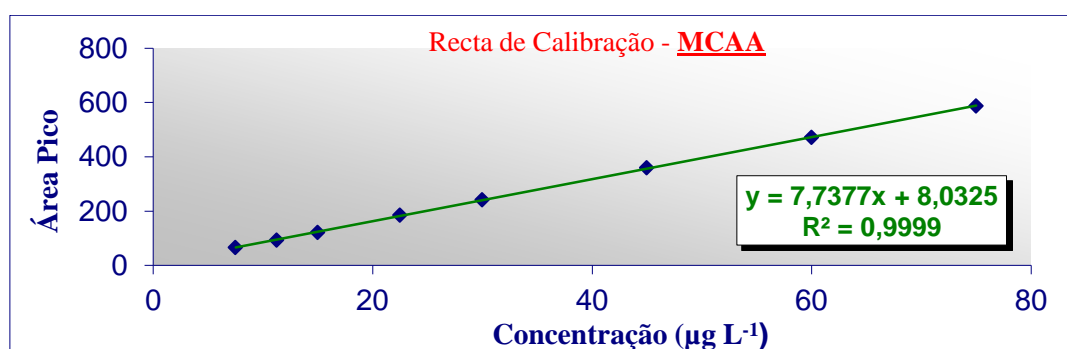
$b$  – Declive da reta

$x$  – Valores individuais de concentração conhecida na solução padrão

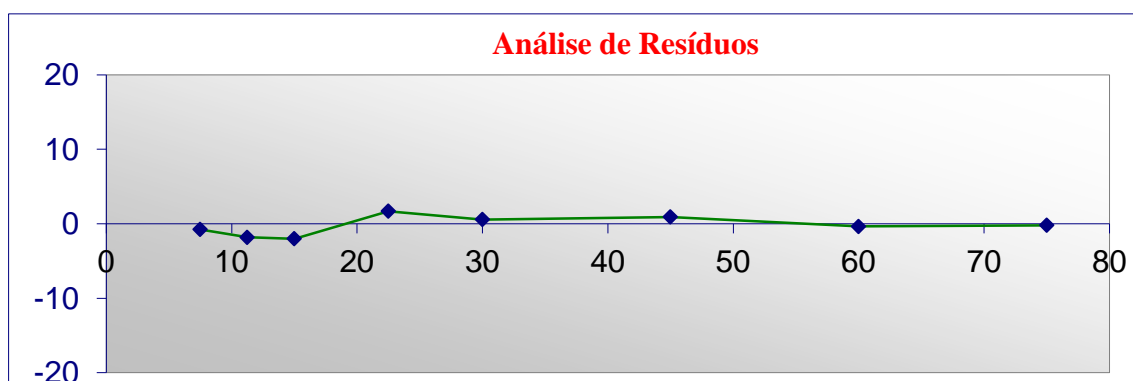
O resíduo representa o quociente entre os valores experimentais e os valores estimados da área da reta de calibração, em percentagem. Após o cálculo destes valores, foi traçado um gráfico de resíduos (%) *versus* concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (96).

### Reta de calibração -MCAA

Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Área de Pico
7,5	66
11,3	93
15,0	122
22,5	185
30,0	242
45,0	359
60,0	471
75,0	587



Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Desvio ( % )
66,07	0,99	7,5	-0,8
95,08	0,98	11,3	-1,8
124,10	0,98	15,0	-2,0
182,13	1,02	22,5	1,7
240,16	1,01	30,0	0,6
356,23	1,01	45,0	0,9
472,30	1,00	60,0	-0,4
588,36	1,00	75,0	-0,2





### Anexo 3 – Teste das Áreas Normalizadas

A distribuição dos valores normalizados tem como objetivo avaliar a dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores ótimos, para que não seja superior a um intervalo previamente estabelecido.

A partir da equação da reta obtida na regressão linear, estimaram-se as áreas de pico, para as concentrações usadas. Para cada uma destas áreas, calculou-se a razão entre o valor de área obtida experimentalmente e o valor da área estimada através da regressão linear.

A concentração para a qual esta razão se aproxima mais de 1 é denominada  $C_{100}$ , ou seja é a concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação. Aplicou-se então a equação 43 a cada uma das concentrações:

$$\text{Área Normalizada} = \frac{\left( \frac{A_i}{C_i} \right) \times (100 \times C_{100})}{A_{100}} \quad (\text{Equação 43})$$

Sendo:

$A_i$  - Área do pico correspondente a uma determinada concentração

$C_i$  - Concentração correspondente à área  $A_i$

$A_{100}$  - Área do pico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

$C_{100}$  - Concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

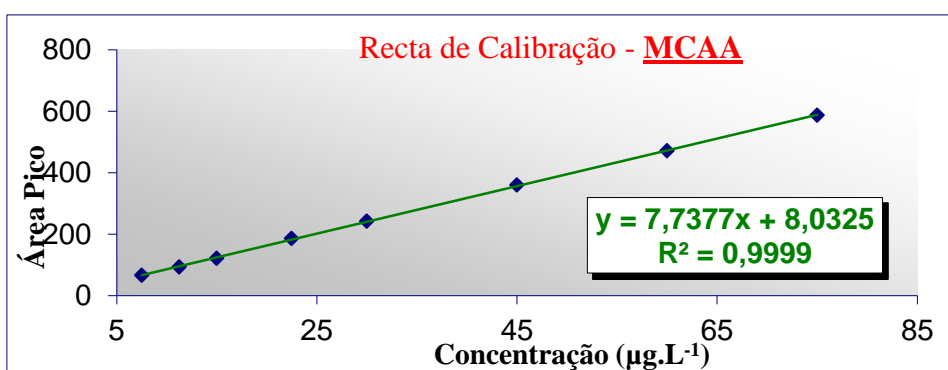
Após o cálculo destes valores, foi traçado um gráfico de valores normalizados *versus* a concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Para admitir a existência de linearidade, numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores normalizados não podiam ter um desvio superior a 15%, isto é, deverão estar compreendidos entre 85 e 115%.

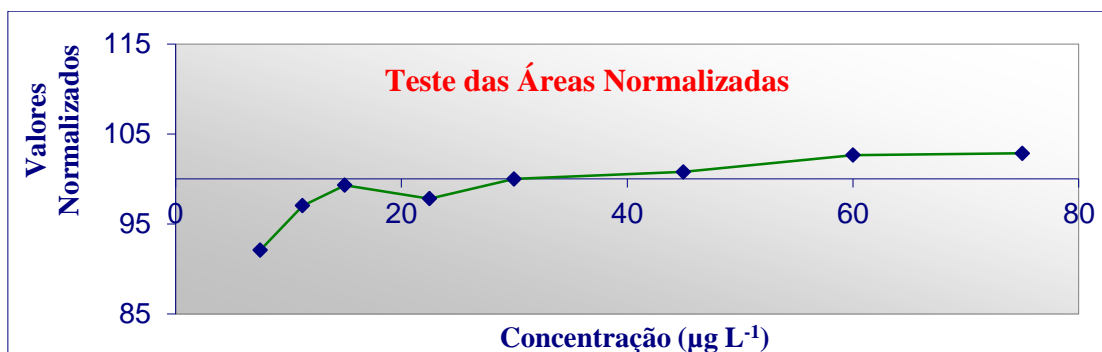
Sempre que existirem valores normalizados que apresentem um desvio superior a 15% devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos (9).

### Teste das Áreas Normalizadas - MCAA

Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Área de Pico
7,5	66
11,3	93
15,0	122
22,5	185
30,0	242
45,0	359
60,0	471
75,0	587



Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Valores Normalizados
66,07	0,992	7,5	92,1
95,08	0,982	11,3	97,0
124,10	0,980	15,0	99,3
182,13	1,017	22,5	97,8
240,16	1,006	30,0	100,0
356,23	1,009	45,0	100,8
472,30	0,996	60,0	102,6
588,36	0,998	75,0	102,8



## Anexo 4 - Teste de Rikilt

O teste de RIKILT permite a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração. Para isso, traçar um gráfico da linearidade de modo a avaliar o seu comportamento linear. Para cada concentração  $x$ , e para cada sinal instrumental  $y$ , determinar a razão  $y/x$ .

Calcular a média de todas as razões  $y/x$  para todos os pontos de calibração ( $x$ ). Ao valor médio atribuir um valor de 100% e calcular a percentagem de cada valor  $y/x$  em relação ao valor médio, através da expressão:

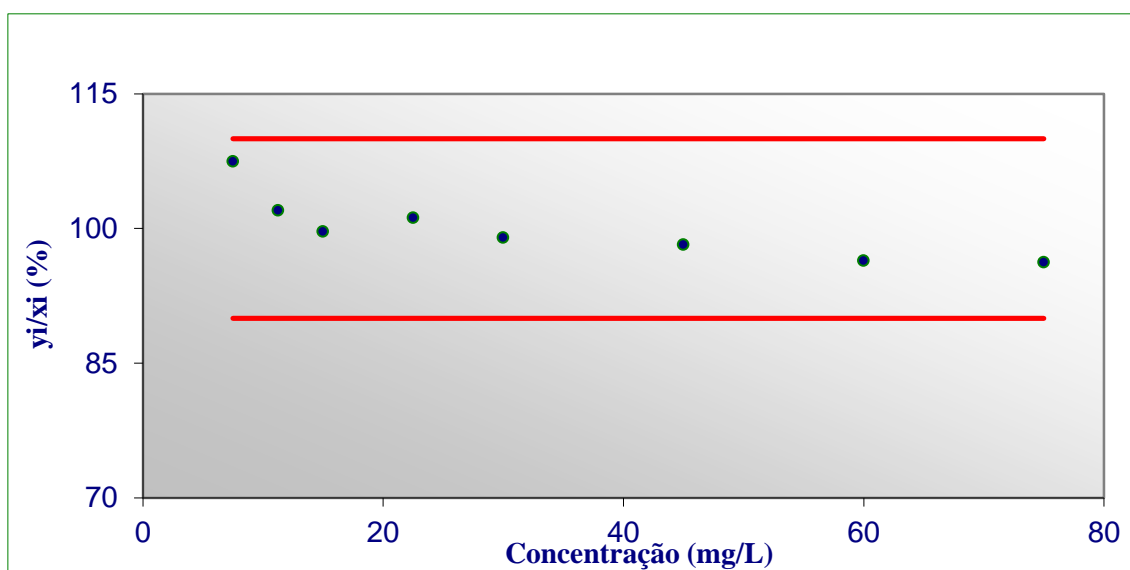
$$y/x (\%) = 100 \times \frac{(y/x)}{y/x} \quad (\text{Equação 44})$$

No eixo das abcissas colocar o valor das concentrações e no eixo das ordenadas o valor, em percentagem, da razão  $y/x$ .

Para uma linearidade perfeita, cada ponto de calibração, deveria dar um valor de 100%. Para admitir linearidade numa determinada gama de trabalho, definiu-se que a razão percentual de  $y/x$  não deve apresentar um valor de desvio superior a 10%, ou seja, os valores devem estar entre 90 e 110%. Caso exista valores que se encontrem fora deste intervalo, esses valores devem ser rejeitados e o teste de RIKILT novamente aplicado à gama reduzida, até que se verifiquem os requisitos estabelecidos (97).

**Teste de Rikilt - MCAA**

Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) = $x_i$	Área = $y_i$	Razão $y_i / x_i$	% $y_i / x_i$	Limite Superior	Limite Inferior
7,5	65,6	8,7	107	110	90
11,3	93,4	8,3	102	110	90
15,0	121,6	8,1	100	110	90
22,5	185,2	8,2	101	110	90
30,0	241,5	8,1	99	110	90
45,0	359,5	8,0	98	110	90
60,0	470,6	7,8	96	110	90
75,0	587,1	7,8	96	110	90



## Anexo 5 - Teste de Mandel

A linearidade pode ser avaliada através de um modo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1, pelo teste de Fisher/Snedecor ou teste de Mandel.

A partir do conjunto de resultados obtidos (sinal instrumental vs concentração), conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear (ISO 8466-1) e a função de calibração não-linear (ISO 8466-2), bem como os respetivos desvios padrão residuais,  $s_{y/x}$  e  $s_{y2}$ , a partir das equações 44 e 45 (91, 98):

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - 2}} \quad \text{(Equação 44)}$$

$$s_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N - 3}} \quad \text{(Equação 45)}$$

Em que:

$N$  - Número de padrões de calibração

$y_i$  - Sinal obtido para um padrão de determinada concentração

$\bar{y}_i$  - Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração

$y_{i2}$  - Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração

Calcula-se a diferença de variâncias ( $DS^2$ ) através da seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2) \times s_{y/x}^2 - (N - 3) \times s_{y2}^2 \quad \text{(Equação 46)}$$

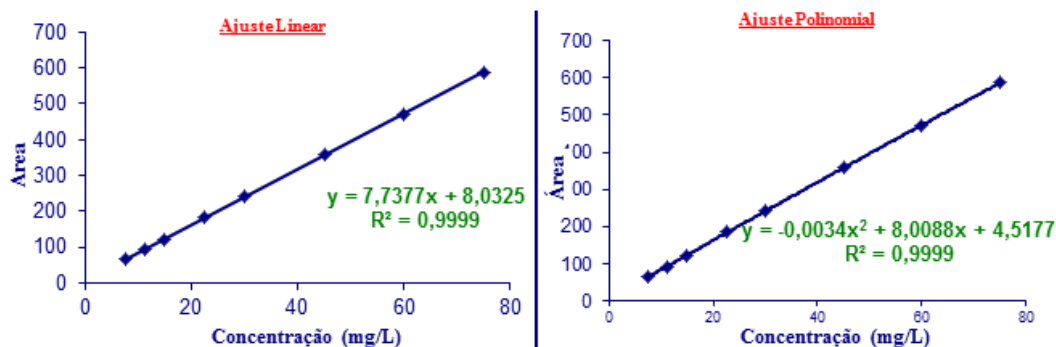
Obtém-se o valor teste,  $VT$  :

$$VT = \frac{DS^2}{s_y^2} \quad (\text{Equação 47})$$

O valor teste ( $VT$ ) é comparado com o valor tabelado da distribuição  $F$  de Fisher/Snedecor, para um grau de confiança de 95%. Se  $VT \leq F$ , a função de calibração é linear. Se  $VT > F$ : a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível de forma a cumprir os requisitos do método.

**Teste de Mandel - MCAA**

Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
7,5	65,6	66,1	64,4
11,3	93,4	95,1	94,2
15,0	121,6	124,1	123,9
22,5	185,2	182,1	183,0
30,0	241,5	240,2	241,7
45,0	359,5	356,2	358,0
60,0	470,6	472,3	472,8
75,0	587,1	588,4	586,1



<i>Ajuste Linear</i>	<i>Ajuste Polinomial</i>
$(y-y_i)^2$	$(y-y_i)^2$
2,487E-01	1,379E+00
2,999E+00	6,995E-01
6,241E+00	5,220E+00
9,419E+00	4,864E+00
1,876E+00	3,548E-02
1,037E+01	2,020E+00
2,873E+00	4,865E+00
1,527E+00	1,150E+00

Soma =	2,023E+01
N-3 =	5

		$S_{y/x(2^a)} =$	2,012E+00
Soma =	3,556E+01		
N-2 =	6		
$S_{y/x} =$	2,434E+00		

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S^2$$

$$DS^2 = 1,532E+01$$

$$VT = DS^2 / S_{y/x(2^a)}^2$$

$$VT = 3,786E+00$$

$$F_{(1,7)95\%} = 6,61$$

Como  $VT < F$ , a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.



## Anexo 6 – Cálculo de Incertezas

As fontes de incerteza consideradas neste trabalho foram as seguintes: incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração; incerteza associada à precisão; incerteza associada a ensaios de recuperação (efeito de matriz); incerteza associada à preparação de padrões de calibração.

As componentes de incerteza padrão relativa usadas nestas duas abordagens foram estimadas a partir dos dados de validação e/ou do controlo da qualidade do ensaio. Estas componentes de incerteza podem ser combinadas da seguinte forma: quando o método é aplicável numa gama restrita de concentrações, as componentes de incertezas podem ser contabilizadas simplesmente como componentes independentes de uma expressão aditiva. Neste caso, a incerteza padrão combinada ( $u_C(C)$ ) de uma determinada grandeza  $C$ , pode ser calculada pelas seguintes expressões de acordo com o tipo de abordagem :

$$u_C(C) = \sqrt{u_{\text{padrão}}^2 + u_{\text{recta}}^2 + u_{\text{prec}}^2} \quad (\text{Equação 48})$$

ou

$$u_C(C) = \sqrt{u_{\text{prec}}^2 + u_{\text{exact}}^2} \quad (\text{Equação 49})$$

Em determinadas situações é aceitável considerar certos componentes como desprezáveis, e como tal, não serem contabilizados no balanço final. Como critério para se considerar um componente como desprezável, deverá ser usada a relação de 1/5 do maior componente considerado.

A incerteza expandida, simbolicamente representada por  $U(C)$ , é a medida da incerteza, dada para uma função de distribuição de probabilidade apropriada ao resultado (distribuição normal), para um nível elevado de confiança (normalmente de aproximadamente 95% ou 99%). A incerteza expandida é igual à incerteza combinada afectada de um coeficiente ou factor de expansão, normalmente situado entre 2 e 3. Habitualmente é utilizado um factor de expansão de  $k=2$  (correspondente a um nível de confiança de aproximadamente 95%).

A incerteza expandida é assim determinada a partir da incerteza combinada pelas seguintes expressões:

$$U(C) = k \times u_c(C) \quad (\text{Equação 50})$$

$$U(C) = 2 \times u_c(C) \quad (\text{Equação 51})$$

Com base no valor da incerteza expandida, a concentração mais provável obtida numa amostra será dada por:

$$C \pm U(C) \text{ [unidades de concentração]} \quad (\text{Equação 52})$$

A incerteza associada ao resultado deverá ser apresentada com um ou no máximo dois algarismos significativos (no caso do Laboratório Central da EPAL – Equipa de Química Orgânica é considerado um algarismo significativo). O resultado do ensaio deverá ser apresentado com um número de dígitos que será limitado pela incerteza do resultado (99, 100).

## Anexo 7 – Segurança e Ambiente

As instalações e condições ambientais existentes nos laboratórios da EPAL visam assegurar as condições necessárias a um bom funcionamento dos laboratórios de ensaio, proporcionando segurança e bem estar aos profissionais e tentando minimizar a possibilidade de acidente.

Os locais de trabalho estão providos de condições de arejamento/ventilação, de iluminação e de limpeza adequadas. O ambiente nos laboratórios está termostatzado, permitindo um controlo da temperatura ambiente.

Para a manipulação de produtos que produzem vapores tóxicos e/ou inflamáveis estão disponíveis *hottes* para a seu manuseamento. Na preparação das soluções utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foi necessário trabalhar sempre em *hottes*, pelo facto dos padrões dos ácidos haloacéticos serem tóxicos e irritantes, podendo a exposição repetida a estes compostos altamente tóxicos provocar, a longo prazo, efeitos na saúde dos profissionais. Para além disso era também utilizado material corrente de laboratório tal como, luvas, bata e óculos de protecção, uma vez que os produtos eram extremamente perigosos em contacto com a pele.

Como é sabido, em caso de acidente é necessário ter em conta determinadas medidas de socorro, nomeadamente, se houver contato do produto com os olhos deve-se lavar imediatamente os olhos com água corrente; em caso de contato direto com a pele, por exemplo nas mãos, deve-se proceder à lavagem de imediato com água corrente e caso a irritação persista, é necessário procurar um médico, se o reagente cair sobre a roupa, é necessário retirá-la o mais rápido possível. Em caso de inalação e ingestão deve procurar-se um médico de imediato. Em caso de acidente existe um manual de primeiros socorros em cada laboratório de ensaio.

Encontra-se também instalado no laboratório um sistema de alarme e detecção de incêndios, com vista a minorar os efeitos causados por um eventual acidente, para além dos extintores distribuídos pelas diversas áreas laboratoriais. O laboratório possui ainda um sistema automático de detecção de gases, garantindo a segurança em caso de fuga.

A EPAL, possui um sistema integrado de desenvolvimento organizacional de recolha de resíduos laboratoriais. Promove os valores e as preocupações ambientais com o objetivo de contribuir ativa e responsavelmente para um futuro ambientalmente sustentado prevenindo a poluição e acidentes ambientais graves.

Todos os resíduos resultantes das atividades laboratoriais são classificados e enviados posteriormente para reciclagem, usando para o efeito recipientes adequados existentes nas instalações.

O presente trabalho teve como principais resíduos sólidos vials, pipetas Pasteur, frascos de reagentes e fibras de SPME. Para a recolha destes resíduos sólidos existem recipientes apropriados nos diferentes laboratórios. Para os resíduos líquidos existem recipientes de plástico nos laboratórios (*Jerricans*), uns para os solventes halogenados e outros para os não halogenados, sendo nestes últimos que se integram os produzidos neste trabalho (metanol e água).

Os resíduos são armazenados provisoriamente no ECOLAB (armazém específico de resíduos), sendo posteriormente reencaminhados para tratamento por uma empresa licenciada para o efeito.

## Anexo 8 – Orçamento

Uma das desvantagens da validação de métodos analíticos em qualquer laboratório, além do tempo necessário para o desenvolvimento do método, é o custo que implica. No entanto, a validação de métodos analíticos é uma componente necessária, com o objetivo de garantir a qualidade dos resultados obtidos nas análises em rotina.

Inicialmente começaram-se estudos de otimização do método SPME-GC/ITMS e, embora não se tenha prosseguido com a metodologia analítica, é necessário ter em conta os custos associados aos componentes utilizados, que se encontram discriminados na tabela 42.

**Tabela 42-** Custos associados ao método SPME-GC/ITMS.

Material	Marca	Quantidade	Preço/€
Fibra CAR-PDMS	Supelco	2 CX	740
Fibra PDMS	Supelco	2 CX	740
Fibra PA	Supelco	1 CX	370
Fibra PDMS/DVB	Supelco	1 CX	370
Fibra DVB-CAR/PDMS	Supelco	1CX	370
Coluna VF-5MS	Varian	1 UN	618,1
Vials 1,5 mL	VWR International	1 CX	18,6
<b>Padrões Analíticos</b>			
Cloroacetato de metilo	Chem Service	2 CX	126
Bromoacetato de metilo	Chem Service	2 CX	126
Dicloroacetato de metilo	Chem Service	2 CX	126
dibromoacetato de metilo	Chem Service	2 CX	136
Bromocloroacetato de metilo	Chem Service	2 CX	137
tricloroacetato de metilo	Chem Service	2 CX	137
Tribromoacetato de metilo	Chem Service	2 CX	137
Bromodicloroacetato de metilo	Chem Service	2 CX	137
Clorodibromoacetato de metilo	Chem Service	2 CX	137
<b>Reagentes</b>			
MTBE	Merck	0,5 L	20,65
Metanol	Merck	1 L	6,7
Acetona	Merck	1 L	11,2
<b>Gases</b>			
Hélio	Gasin	1 GAR	41
<b>Total</b>			<b>4505,25</b>

Estudos de otimização realizados para a metodologia analítica SPME-GC/ITMS apresentaram um custo de, aproximadamente, 4500 €.

Depois de se abandonar a metodologia analítica SPME-GC/ITMS, foi-se desenvolver um método de ensaio de análise dos HAAs por UPLC-MS/MS.

Na tabela 43, encontram-se apresentados os valores de cada componente utilizado para o orçamento global da validação efetuada. As quantidades apresentadas resultam de uma estimativa feita do material utilizado durante o decorrer do trabalho laboratorial. Não se entrou com os custos associados ao material corrente de laboratório nem aos equipamentos utilizados.

**Tabela 43-** Custos associados ao método UPLC-MS/MS.

Material	Marca	Quantidade	Preço/€
Vials UPLC	Waters	5 CX	970
Colunas	Waters	1 UN	792
<b>Padrões Analíticos</b>			
Ácido monocloraacético	Chem Service	2 CX	110
Ácido monobromoacético	Chem Service	2 CX	112
Ácido dicloroacético	Chem Service	2 CX	112
Ácido dibromoacético	Chem Service	2 CX	120
Ácido bromocloroacético	Chem Service	2 CX	128
Ácido tricloroacético	Chem Service	2 CX	140
Ácido tribromoacético	Chem Service	2 CX	140
Ácido bromodicloroacético	Chem Service	2 CX	138
Ácido clorodibromoacético	Chem Service	2 CX	138
<b>Reagentes</b>			
Metanol	Merck	1 L	6,79
Acetonitrilo	Merck	7,5 L	100,8
Ácido acético	Merck	0,5 L	2,56
<b>Gases</b>			
Azoto	Gasin	5 GAR	211,65
<b>Total</b>			<b>3221,76</b>

Os estudos de otimização e validação para a análise os HAAs feitos na metodologia analítica UPLC-ESI-MS/MS apresentaram um custo de aproximadamente 3200 €.